



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA



**Bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de
nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L. en Virú,
región La Libertad y su potencial como promotoras de
crecimiento en plantas**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Br. Jorge Kevin Delgado Soberón

Br. Juana Liyí Suyón Cerna

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

**Bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de
nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L. en Virú,
región La Libertad y su potencial como promotoras de
crecimiento en plantas**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

APROBADO POR:

Dr. Eduardo Tejada Sánchez

PRESIDENTE

MSc. Consuelo Rojas Idrogo

SECRETARIO

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la investigación	4
2.2. Base teórica	8
2.2.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	9
2.2.2. <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago”	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Materiales.....	15
3.1.1. Material biológico	15
3.1.2. Población y muestra.....	15
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Variables de la fase descriptiva	15
3.2.2. Variables de la fase experimental	15
3.2.3. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	16
3.2.4. Lugar de muestreo	16
3.2.5. Obtención de muestras	19
3.2.6. Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno	19
3.2.7. Aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno...	27
3.2.8. Identificación fenotípica de bacterias endófitas y rizosféricas.	29
3.2.9. Mantenimiento de cultivo de bacterias	29
3.2.10. Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos.....	31
3.2.11. Selección de bacterias endófitas y rizosféricas.....	35
3.2.12. Efecto de bacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago	35
3.2.13. Análisis estadístico de los datos	39
IV. RESULTADOS	40
4.1. Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	40
4.2. Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	52
4.3. Géneros de bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno identificadas fenotípicamente	62
4.4. Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos por bacterias endófitas y rizosféricas.....	65
4.5. Bacterias endófitas y rizosféricas seleccionadas	85
4.6. Efecto de bacterias endófitas y rizosféricas en <i>Asparagus officinalis</i> L.	85

V. DISCUSIÓN.....	108
VI. CONCLUSIONES	117
VII. RECOMENDACIONES.....	118
VIII. RESUMEN.....	119
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad	18
Tabla 2. Análisis físico-químico de suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Virú, La Libertad, 2016	20
Tabla 3. Características diferenciales de las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas	64
Tabla 4. Características diferenciales de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias	66
Tabla 5. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias endófitas aisladas de raíces <i>Asparagus officinalis</i> L.	68
Tabla 6. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias endófitas aisladas de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	70
Tabla 7. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas aerobias aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	72
Tabla 8. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas microaerófilas aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	74
Tabla 9. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias endófitas aisladas de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L.	77
Tabla 10. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias endófitas aisladas de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	79
Tabla 11. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias rizosféricas aerobias aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	81
Tabla 12. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias rizosféricas microaerófilas aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	83
Tabla 13. Indoles producidos (ppm) por bacterias endófitas aisladas de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L.	87
Tabla 14. Indoles producidos (ppm) por bacterias endófitas aisladas de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	89
Tabla 15. Indoles producidos (ppm) por bacterias rizosféricas aerobias aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	91
Tabla 16. Indoles producidos (ppm) por bacterias rizosféricas microaerófilas aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	93
Tabla 17. Características de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas e identificadas en <i>Asparagus officinalis</i> L.	95

Tabla 18. Índices de efectividad (%) de bacterias endófitas y rizosféricas en la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días.....	97
Tabla 19. Prueba de Tukey de la altura de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	99
Tabla 20. Índices de efectividad (%) de bacterias endófitas y rizosféricas en el número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días	100
Tabla 21. Prueba de Tukey del número de tallos de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de bacterias endófitas y rizosféricas en el desarrollo vegetativo de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	17
Figura 2. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Virú, región La Libertad, 2016	18
Figura 3. Extracción de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L.	20
Figura 4. Fragmentos de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	21
Figura 5. Lavado de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con agua potable.....	21
Figura 6. Fragmentos de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. en papel secante esterilizado	23
Figura 7. Macerado de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. desinfectadas	23
Figura 8. Separación del macerado de <i>Asparagus officinalis</i> L.	24
Figura 9. Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno	24
Figura 10. Siembra del macerado de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. en medio semisólido sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias endófitas.....	25
Figura 11. Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos.....	25
Figura 12. Subcultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medios semisólidos	26
Figura 13. Raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. deshidratadas.....	28
Figura 14. Suspensión de raíces y suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución salina esterilizada.....	28
Figura 15. Cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno	30
Figura 16. Caldo extracto de suelo cultivado con bacterias endófitas y rizosféricas	32
Figura 17. Caldo National Botanical Research Institute's phosphate	34
Figura 18. Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con bacterias endófitas y rizosféricas	34
Figura 19. Coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	36

Figura 20. Inmersión de coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución de fungicida	36
Figura 21. Inóculo de bacterias endófitas y rizosféricas en solución salina esterilizada	38
Figura 22. Inóculo bacteriano asperjado en corona de <i>Asparagus officinalis</i> L.	38
Figura 23. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio NFb	41
Figura 24. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGI	41
Figura 25. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGIP	42
Figura 26. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio JNFb.....	42
Figura 27. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio JMV	43
Figura 28. Frecuencia de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016	44
Figura 29. Frecuencia de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016	44
Figura 30. Frecuencia de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016	45
Figura 31. Frecuencia de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016	45
Figura 32. Frecuencia de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGIP después de la siembra y tres subcultivos, 2016	47
Figura 33. Frecuencia de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016	48
Figura 34. Frecuencia de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016	48

Figura 35. Frecuencia de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016	49
Figura 36. Frecuencia de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016	49
Figura 37. Frecuencia de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos	50
Figura 38. Cultivos puros en agar nutritivo de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno provenientes de raíces	50
Figura 39. Cultivos puros en medios sin nitrógeno de bacterias endófitas fijadoras provenientes de raíces.....	51
Figura 40. Porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L. en cinco medios semisólidos ...	51
Figura 41. Frecuencia de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos	53
Figura 42. Porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. en cinco medios semisólidos.....	53
Figura 43. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio LGD	54
Figura 44. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio LG.....	54
Figura 45. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio Beijerinckia	55
Figura 46. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios sólidos.....	55
Figura 47. Cultivos puros de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias	56
Figura 48. Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios sólidos.....	56
Figura 49. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio NFb ..	57
Figura 50. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio JNFb	57

Figura 51. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016	59
Figura 52. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016	59
Figura 53. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016	60
Figura 54. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016.....	60
Figura 55. Frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. con bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas en cuatro medios semisólidos después de tres subcultivos	61
Figura 56. Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas de suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en cuatro medios semisólidos	61
Figura 57. Frecuencia de géneros identificados en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	63
Figura 58. Coloración observada en la cuantificación de amonio.....	67
Figura 59. Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble	76
Figura 60. Coloración observada en la cuantificación de indoles	86
Figura 61. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azospirillum</i> sp.NFb3ET.....	96
Figura 62. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb19ER.....	96
Figura 63. Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	97
Figura 64. Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	100
Figura 65. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azospirillum</i> sp. NFb3ET.....	102

Figura 66. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb19ER.....	102
Figura 67. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp.LG16.28.....	103
Figura 68. Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	103
Figura 69. Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	104
Figura 70. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, aaaaaa c) <i>Azospirillum</i> sp. NFb3ET.....	106
Figura 71. Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, aaaaaa c) <i>Azotobacter</i> sp. LG16.28	106
Figura 72. Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	107
Figura 73. Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.....	107

I. INTRODUCCIÓN

El suelo sostiene la producción agrícola y junto a los océanos son la fuente más importante de alimento para los humanos y animales; no obstante, el suelo es continuamente contaminado y degradado (Ortuño et al., 2013) por múltiples causas, entre las que destacan las malas prácticas agrícolas como la aplicación excesiva de fertilizantes químicos. Estos insumos correctamente utilizados incrementan la productividad y rentabilidad de los cultivos; no obstante, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es en promedio 50% para el nitrógeno (SAGARPA, 2010). El resto se pierde por volatilización, desnitrificación, lixiviación y erosión (Pedraza et al., 2010; Salhia, 2010). Las emisiones liberadas hacia la atmósfera en formas de amoníaco, óxido nítrico y nitroso causan lluvia ácida y destruyen la capa de ozono. Las escorrentías agrícolas originan eutrofización de las aguas superficiales y los nitratos lixiviados contaminan los mantos freáticos, afectando negativamente a los seres vivos (Aguado, 2012).

El cultivo de *Asparagus officinalis* “espárrago” es económicamente considerable. La producción ($8\,274\,335\text{ taño}^{-1}$) a nivel mundial está liderada por China, seguida por Perú, México y Alemania (Kirschenbilder et al., 2015). En el Perú destacan Trujillo, Ica, Huaraz, Lima y Lambayeque como productores de espárrago (MINAGRI, 2014). El nitrógeno que este cultivo requiere puede ser proporcionado en parte o totalmente por las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes, que reducen enzimáticamente el nitrógeno atmosférico, transformándolo en amoníaco, el cual es incorporado para el crecimiento y mantenimiento de las células (Altamirano & Plasencia, 2014).

Las bacterias diazotróficas son rizosféricas y endófitas. Las rizosféricas son de vida libre y habitan en la superficie de la raíz o en la rizósfera, aunque bajo ciertas circunstancias pueden ocupar espacios intracelulares superficiales de la planta (Ramírez & Ugaz, 2014). Las bacterias endófitas colonizan los tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares y dentro de los tejidos, sin causar algún daño aparente (Pérez et al., 2010). Las bacterias endófitas y rizosféricas además de fijar nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen ácido indolacético y controlan fitopatógenos, por lo que son consideradas promotoras de crecimiento vegetal, BPCV o rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), PGPR (Loaces, 2011; Ji et al., 2013; Mbai et al., 2013).

La producción orgánica es una prioridad en todos los países, principalmente en los productos de exportación como el espárrago, requiriéndose desarrollar tecnologías como los biofertilizantes basados en microorganismos vivos; sin embargo, en las zonas esparragueras de Trujillo no se ha realizado investigación para aislar y caracterizar bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno y determinar si tienen potencial como promotoras de crecimiento en plantas, como punto de partida para futuras investigaciones en la obtención de un inoculante comercial.

La presente investigación permitirá aislar e identificar bacterias propias de la región con potencial para la biofertilización, generando valor agregado a la biodiversidad regional, a la vez que se disminuye el riesgo de la salud de los seres vivos y el efecto negativo de los insumos químicos en el ambiente. Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuál es el potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de *Asparagus officinalis* L.?. El objetivo general fue aislar bacterias endófitas y rizosféricas de espárrago y determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas.

Los objetivos específicos fueron: aislar e identificar bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno en raíces, tallos y suelo rizosférico de plantas de espárrago, cuantificar el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado y los indoles producidos *in vitro* por las bacterias, seleccionar los cinco cultivos de bacterias con los mayores valores en el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos y determinar el efecto de las bacterias seleccionadas en la altura y número de tallos de plantas de espárrago. La hipótesis planteada fue: Las bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de espárrago fijan nitrógeno, solubilizan fosfato, producen indoles e incrementan el desarrollo vegetativo de las plantas de espárrago.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Las bacterias del género *Herbaspirillum* endófitas fijan nitrógeno, producen fitohormonas y promueven el crecimiento vegetal. Se realizó una investigación para caracterizar y seleccionar estas bacterias en el cultivo de *Oryza sativa* L. “arroz”. Se colectaron 20 plantas en estado vegetativo y al inicio de floración. Las hojas y tallos se desinfectaron, se maceraron, se realizaron diluciones seriadas, se inocularon frascos con medios de cultivo JNFb semisólido y se incubaron a 35°C por 4-7 días. Después de un subcultivo en este mismo medio, las bacterias se aislaron en medio sólido JNFb con extracto de levadura y en medio Batata. Se obtuvieron 113 aislados, identificándose fenotípicamente el 9,73% como *Herbaspirillum* spp. La cepa 4.2 incrementó significativamente la biomasa aérea de plantas de arroz en invernadero. La secuenciación del gen ARNr 16S confirmó esta bacteria como *Herbaspirillum*, concluyéndose que tiene potencial como biofertilizante (Punschke & Mayans, 2011).

Los microorganismos endófitos asociados a plantas de *Chenopodium quinoa* “quinua” se investigaron en 20 campos de cultivo orgánico. Se colectaron muestras de raíces, hojas, tallos y los microorganismos se aislaron en agar Tripticasa soya (TSA) y agar papa dextrosa (PDA). Se aislaron 103 bacterias endofíticas en raíces (55), hojas (40) y tallos (8), identificándose *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*. En pruebas de laboratorio se determinó que el 69,9% solubilizó fósforo en medio National Botanical Research Institute’s phosphate, NBRIP; 57% sintetizó ácido indolacético detectado por el método colorimétrico de Salkowski y 29% fijó nitrógeno en medio semisólido. Algunos aislados presentaron múltiple función, tal que 70% de los aislados fue

caracterizado como PGPR. Estas bacterias (0,5 mL de suspensión 10^8 UFCmL⁻¹) se inocularon en suelo esterilizado, antes de la siembra de semillas de quinua y después de 8 semanas se determinó incremento en la altura y peso de la panícula, destacando *B. subtilis* 11 fijador de nitrógeno (Ortuño et al., 2013).

La capacidad de la bacteria endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* de fijar nitrógeno y proporcionar al cultivo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” cantidades significativas de nitrógeno, sin formación de nódulos, evidencia su potencial para otras monocotiledóneas, como el maíz. Se realizó una investigación para determinar la correlación entre el contenido de sacarosa en el maíz y la colonización de *G. diazotrophicus* y para determinar la eficiencia del tratamiento del suelo, inmersión de la raíz y los métodos asépticos de inoculación en condiciones de invernadero. La bacteria fue detectada en siete genotipos de maíz, con diferentes niveles de sacarosa, alcanzándose 93% en la eficiencia de inoculación aséptica (Eskin, 2012).

Las bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Zea mays* L. “maíz”, se investigaron como una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Las raíces se lavaron, se desinfectaron, se enjuagaron con solución tampón y agua destilada esterilizada y se maceraron. El macerado se sembró en los medios sin nitrógeno NFB y LGI para *Azospirillum* spp., JNFB para *Herbaspirillum*, LGI-P para *Gluconacetobacter* y JMV para *Burkholderia* spp. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y por el viraje del indicador, siendo aisladas en sus respectivos medios sólidos. Se obtuvieron 132 cultivos bacterianos entre los que se indentificó *Azospirillum* (45,5%), *Herbaspirillum* (6,1%), *Gluconacetobacter* (7,6%) y *Burkholderia* (2,3%). Estas bacterias fijaron nitrógeno *in vitro*, alcanzando 5,75-33,17 ppm de amonio (*Azospirillum* spp.), 9,61-21,38 ppm (*Herbaspirillum* spp.), 6,0-30,57 ppm (*Gluconacetobacter* spp.) y 9,96-28,78 ppm (*Burkholderia* spp.). Se demostró el potencial de las bacterias endófitas aisladas de maíz como fijadoras de nitrógeno (Altamirano & Plasencia, 2014).

Las bacterias endófitas diazotróficas aisladas de tallos y hojas de arroz se investigaron en condiciones de laboratorio. Los tallos y hojas previamente desinfectados se maceraron y se sembraron en los medios semisólidos sin nitrógeno NFb, LGI, JNFb, LGI-P y JMV. Se obtuvieron 159 cultivos bacterianos entre los que se identificó *Azospirillum* (59,52%), *Burkholderia* (7,15%) y *Herbaspirillum* (4,46%) en tallos. En hojas se identificó *Azospirillum* (51,61%) y *Herbaspirillum* (25,81%). Estas bacterias fijaron nitrógeno *in vitro*, alcanzando 28,22 ppm de amonio con *A. brasilense* 16AT4; 23,0 ppm con *Herbaspirillum* sp. 5DT2-1 y 19,25 ppm con *Burkholderia* sp. 1AT1-1. Con los aislados de hojas se alcanzó 19,58 ppm de amonio con *A. halopraeferens* 6BH2 y 21,38ppm con *Herbaspirillum* sp. EDH1. Se demostró la efectividad de las bacterias endófitas como fijadoras de nitrógeno (Hernández, 2015).

Las bacterias rizosféricas habitan en la superficie de las raíces o en el suelo rizosférico, aunque bajo determinadas circunstancias pueden colonizar espacios intercelulares superficiales de las plantas (Beracochea, 2011). Las bacterias rizosféricas diazotróficas aisladas de arroz, se investigaron en su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Se colectaron muestras de suelo rizosférico, se diluyeron en solución salina esterilizada y alícuotas de 0,1 mL se sembraron en los medios semisólidos NFb, LGI, JNFb, LGI-P, JMV, así como en los medios sólidos LG, LGD y Beijerinckia. Se obtuvieron 103 cultivos de bacterias diazótrofes microaerófilas (*Azospirillum*: 33,98% y *Burkholderia*: 2,91%) y 71 cultivos de bacterias diazótrofes aerobias (*Azotobacter*: 14,08% y *Beijerinckia*: 25,35%). Todas las bacterias fijaron nitrógeno *in vitro*, alcanzando 5,75-33,17 ppm (*Azospirillum* spp.), 9,61-21,38ppm (*Burkholderia* spp.), 6,0-30,57 ppm (*Azotobacter* spp.) y 9,96-28,78 ppm (*Beijerinckia* spp.). Se demostró la fijación de nitrógeno por las bacterias rizosféricas aisladas de arroz (Ramírez & Ugaz, 2014).

En los sistemas pastoriles, *Lolium perenne* L. es fundamental en la alimentación animal. Con el fin de incrementar su calidad nutricional, se aislaron bacterias de la rizósfera, para investigar su capacidad de fijación de nitrógeno y síntesis de compuestos indólicos. En caldo NFb libre de nitrógeno las bacterias diazotróficas se reconocieron por el desarrollo de una película blanca, densa y ondulada bajo la superficie y se aislaron en agar Rojo de Congo ácido

málico, a 33°C, por 96 horas, obteniéndose 14 morfotipos. En la prueba de reducción de acetileno, las bacterias C1 y C2 alcanzaron 2507 y 2539 nmol C₂H₄ mL⁻¹ día⁻¹ respectivamente. Asimismo, sintetizaron ácido indolacético (AIA) durante 48 horas. Las pruebas bioquímicas identificaron *Serratia liquefaciens*; no obstante, la secuenciación del ARNr16S correspondió a *Pantoea agglomerans* (Schoebitz, 2006).

Azotobacter y *Azospirillum* son bacterias utilizadas como promotoras del crecimiento vegetal debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y producir hormonas de tipo indólico. Estas bacterias se aislaron de la rizósfera de cultivos de *Gossypium hirsutum* “algodón”. Las poblaciones microbianas se caracterizaron fenotípicamente en los medios de cultivo semiespecíficos: Ashby y LG (*Azotobacter* sp.) y NFb, LGI y Agar papa (*Azospirillum* sp.). La promoción de crecimiento vegetal se determinó mediante la actividad de la enzima nitrogenasa, por la técnica de reducción de acetileno y producción de indoles por el método colorimétrico de Salkowsky. Se obtuvieron nueve aislados de *Azotobacter* sp. y cuatro de *Azospirillum* sp., observándose diferencias significativas en la actividad N³asa, con un rango de 19,87-460,60 nmol C₂H₄ mL⁻¹h⁻¹ y en la producción de indol se alcanzó 20,08 ug mL⁻¹ (Guzmán et al., 2012).

Cuatro rizobacterias previamente aisladas de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” se identificaron a nivel molecular y se investigaron sus propiedades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal. Los cuatro aislados pertenecieron al género *Bacillus*, y en condiciones de laboratorio sintetizaron ácido indolacético (0,9-2,3 mgL⁻¹), solubilizaron fosfato tricálcico (18,5-34,7 mgL⁻¹) y presentaron actividad aminociclopropanocarboxílico (ACC) desaminasa. Tres de ellos fijaron nitrógeno en medio semisólido y dos produjeron sideróforos. Al evaluar el efecto de la inoculación en semillas de tomate se determinó que *Bacillus* MA04 y MA17 aumentaron el porcentaje de germinación en 5-6% y *Bacillus* MA06 y MA12 incrementaron el peso de las plántulas en 17-20%. En semillas de pimiento MA06 incrementó en 7% el porcentaje de germinación y MA12 y MA17 aumentaron en 16-37% la biomasa. *Bacillus* MA12 fue más versátil para

promover el crecimiento, pudiendo ser recomendado para la formulación de biofertilizantes para tomate y pimiento (Luna et al., 2013).

La capacidad de promover el crecimiento de plantas se investigó en bacterias rizosféricas y endófitas de *Eucalyptus nitens*. Se colectaron raíces laterales jóvenes y las bacterias se aislaron en agar King B, almidón caseína y medio de esporulación. Posteriormente, una suspensión (10^7 UFCmL⁻¹) de cada bacteria fue inoculada en las semillas y 4 semanas después de la siembra de *E. nitens*. Se obtuvieron 105 aislados rizosféricos (76) y endófitos (29), entre los que 14,2% incrementó el crecimiento de las plántulas para las variables altura (50%), biomasa radicular (135%) y aérea (142%). El 100% de las bacterias identificadas como *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Arthrobacter* y *Rahnella* produjeron AIA a las 24 horas, el 40% solubilizó fosfato a los 3-5 días y solo el 0,9% presentó actividad de la ACC desaminasa. Se demostró el potencial de las rizobacterias estudiadas como promotoras del crecimiento de *E. nitens* y su posible uso como inoculantes (Angulo et al., 2014).

2.2 Base teórica

La agricultura intensiva moderna se caracteriza por el empleo de sistemas tecnológicos que utilizan plantas muy especializadas y una alta concentración de insumos como fertilizantes, fungicidas, herbicidas, antibióticos, riego, maquinaria agrícola y energía fósil. Una alta y destructiva mecanización, el monocultivo, la concentración de la tierra en grandes empresas y la producción para la explotación también son características de la “Agricultura moderna”; sin embargo, desde una visión ecológica, las técnicas agrícolas introducidas, el afán de lucro de los grandes productores y la necesidad de subsistencia de los campesinos, han producido una grave deforestación en el planeta, aumento de la erosión y pérdida de la capacidad productiva de los suelos (Dávila, 2004).

La agricultura orgánica propone para el crecimiento y desarrollo de los cultivos la utilización de opciones tecnológicas como las bacterias promotoras de crecimiento en plantas para producir alimentos sanos, proteger la calidad del ambiente y la salud humana e intensificar las interacciones biológicas y los procesos naturales beneficiosos. Se comparten los principios de la agricultura natural, ecológica, biodinámica y biológica, promoviendo la sustentabilidad de

los sistemas agrícolas desde el punto de vista productivo, ecológico, económico y social (Dávila, 2004).

Kloepper & Schroth (1978), mencionados por Bhattacharyya & Jha (2012), propusieron el término rizobacterias para las bacterias del suelo que competitivamente colonizaban las raíces, estimulaban el crecimiento de las plantas y a la vez reducían la incidencia de las enfermedades. En 1981, estos mismos investigadores denominaron a estas bacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR). En la actualidad, este concepto se usa para las bacterias que cumplen con dos de los tres criterios establecidos, como son colonización agresiva, estimulación del crecimiento vegetal y biocontrol.

Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), solubilización de fosfatos minerales, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones como los nitratos. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con los patógenos (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica a la planta (Delgado et al., 2003, Hernández et al., 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012).

2.2.1 Bacterias fijadoras de nitrógeno

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva accesible en la biósfera. El 78% de la atmósfera está constituida por N_2 (Mayz, 2004), molécula casi inerte debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, cuya ruptura requiere mucha energía, como la proveniente de la radiación ultravioleta y combustibles fósiles (Baca et al., 2000). En este contexto, el nitrógeno atmosférico puede ser incorporado al ecosistema a través de la fijación biológica de nitrógeno, diazotrofia o reducción a iones amonio, que son utilizados por los seres vivos para la síntesis de compuestos nitrogenados (Menezes, 2009; Pérez et al., 2010).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas pueden ser de vida libre, asociativa y simbiótica. Las de vida libre son heterótrofas y requieren un ecosistema capaz de brindar una fuente de carbono para la fijación del nitrógeno. Las representantes de este grupo son *Beijerinckia* y *Azotobacter*. Un segundo grupo de bacterias, se asocia con las poáceas, pudiendo ser endófitas facultativas y obligadas. Las endófitas facultativas colonizan tanto el suelo rizosférico como el interior de la raíz, siendo el género *Azospirillum* representante de este grupo. A su vez, las diazotróficas endófitas obligadas, colonizan el interior de las raíces, mencionándose especies de *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* y *Burkholderia*. Por su parte, el tercer grupo de bacterias diazotróficas son las simbióticas, que fijan el nitrógeno en el interior de nódulos, diferenciados principalmente en las leguminosas, incluyendo la familia Rhizobiaceae: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Garrido, 2007).

Según su localización las bacterias diazotróficas son rizosféricas y endófitas. Las bacterias rizosféricas son de vida libre y ejercen su efecto de crecimiento desde afuera de la planta, habitando ya sea la superficie de las raíces o el suelo rizosférico; aunque bajo ciertas circunstancias, pueden ocupar espacios intercelulares superficiales de las plantas. Las bacterias endófitas deben encontrarse dentro del tejido vegetal, es decir, traspasar la barrera epidérmica y no causar daño aparente a las plantas (Aguado, 2012). El término endófitas hace referencia a los microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas. En Agronomía, este concepto involucra todos los microorganismos que pueden ser aislados de plantas, cuyos tejidos fueron esterilizados superficialmente y que no causan una enfermedad visible en su planta hospedadora (Loaces, 2011). Según su estrategia de vida, las bacterias endófitas pueden ser obligadas, que dependen del hospedero para su crecimiento, sobrevivencia y dispersión y facultativas que cumplen una etapa de su ciclo fuera del hospedero, generalmente en el suelo (Beracochea, 2011).

Los endófitos pueden ser pasajeros, oportunistas y competentes. En el primer caso, pueden llegar a ser endófitos por casualidad, por ejemplo, a través de la colonización de heridas o después de la invasión de las raíces por nemátodos. Con frecuencia se limitan al tejido cortical de la raíz. Los

endófitos oportunistas, muestran características particulares en la colonización de la raíz, por ejemplo, una respuesta quimiotáctica, que les permite colonizar el rizoplasma y después invadir los tejidos vegetales, a través de grietas formadas en los lugares de emergencia de las raíces laterales y puntas de las raíces; sin embargo, al igual que las endófitas pasajeras se limitan al cortex radicular. Por su parte, los endófitos competentes, poseen todas las propiedades de los endófitos oportunistas y además la maquinaria clave genética necesaria para colonizar, por lo que invaden los tejidos vegetales específicos, como tejidos vasculares, extendiéndose por toda la planta y mediante la manipulación del metabolismo de la planta, mantienen un equilibrio armonioso con el hospedero, incluso cuando están presentes en alta densidad (Loaces, 2011).

En el suelo rizosférico se encuentra la mayor fuente de bacterias endófitas y generalmente es donde comienza el proceso de colonización. Es posible que sea pasiva, cuando las bacterias se encuentran en las semillas y éstas constituyan su medio de dispersión. En las plantas que se propagan vegetativamente, pasan de un lugar a otro con las yemas. La transmisión de las bacterias endófitas obligadas es en forma vertical o vía vectores (Beracochea, 2011).

El primer paso en la colonización es el acercamiento espacial de la bacteria a la superficie de la raíz, por quimiotaxis (ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos excretados por la raíz), luego la bacteria se adhiere y se ancla en la superficie de la raíz, multiplicándose y formando microcolonias. El segundo paso es la invasión de los tejidos internos, penetrando por las aberturas naturales o por liberación de enzimas hidrolíticas. En el tercer paso, los endófitos se multiplican, colonizando los espacios intercelulares y permanecen en un determinado sitio o realizan una colonización sistemática por el sistema vascular o el apoplasto (Beracochea, 2011). En poáceas se han aislado bacterias rizosféricas diazotróficas de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Desulfovibrio*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Beijerinckia*, *Spirillum* y *rizobios*. Las bacterias endófitas diazotróficas incluyen *Gluconacetobacter*,

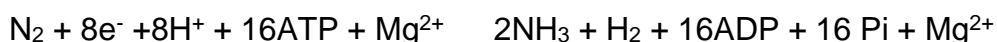
Azoarcus, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pantoea* y *Rhanelia* (Beracochea, 2011; Loaces, 2011).

La fijación de nitrógeno es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, estrictamente procariótico, compuesto por dos proteínas solubles: la proteína del hierro (dinitrogenasa reductasa o Componente II) y la proteína del MoFe (dinitrogenasa, o Componente I). El hierro y molibdeno son cofactores esenciales en la dinitrogenasa. Algunos fijadores de nitrógeno tienen una dinitrogenasa alternativa que contiene vanadio, en lugar de molibdeno; no obstante, esta clase de dinitrogenasa sólo es sintetizada en ausencia de molibdeno disponible. Las dos enzimas del complejo funcionan conjuntamente: la dinitrogenasa reductasa reduce la dinitrogenasa y esta última reduce el nitrógeno (Coyne, 2000; Altamirano et al., 2014).

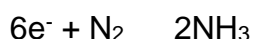
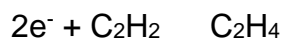
La ecuación para la fijación del nitrógeno es:



Los electrones circulan a través de diversos portadores de electrones y reducen finalmente el nitrógeno: e^- Ferredoxina Flavodoxina Proteína del hierro Proteína del MoFe N_2 . Cada electrón transferido requiere dos ATP; sin embargo, la nitrogenasa no es del todo efectiva y también reduce otros compuestos como el H^+ , N_2O , N_3^- y el CN^- . Por tanto, La ecuación general para la fijación de nitrógeno, catalizada por la nitrogenasa es:



La nitrogenasa también cataliza la transformación de sustratos como el acetileno:



2.2.2 *Asparagus officinalis* L. “espárrago”

El espárrago es originario de la región oriental del Mediterráneo y Asia menor y crece en climas templados y subtropicales, siendo la única especie de su género cultivada como hortaliza. La planta de espárrago presenta una porción subterránea conocida como araña que consiste en un rizoma expandido lateralmente y poco profundo que posee yemas en su extremo apical, raíces carnosas de almacenamiento y raíces laterales de absorción. El crecimiento de la araña ocurre cuando las yemas periféricas originan nuevos grupos de gemación para la próxima generación de la planta (Asprelli et al., 2005).

El ciclo vital de las plantas de espárrago verde se divide en cuatro fases: de crecimiento temprano, los primeros 2 años desde la plantación, caracterizados por un fuerte desarrollo vegetativo, de productividad creciente (3°-4° año) que corresponde a los 2 primeros años de cosecha; de productividad estable (4°-10° año) y finalmente la de productividad decreciente (más de 10 años) la fase correspondiente a la plantación es la más crítica (Kirschenbilder et al., 2015). El aumento de temperatura propicia la emergencia de brotes jóvenes llamados turiones a partir del rizoma. Después de la cosecha, los turiones se desarrollan y forman el follaje o helecho (Asprelli et al., 2005). Las plantas son dioicas siendo más productivas las plantas masculinas que las femeninas. Las estaminadas tienen mayor número de turiones mientras que en las pistiladas los turiones tienen mayor diámetro (Kirschenbilder et al., 2015).

La producción de espárrago constituye una alternativa de alto valor agregado. Es un cultivo perenne que tiene un periodo promedio de cosecha de 10 años y llega al máximo de producción a los 4 o 5 años, tiempo en el que es necesario considerar todos los aspectos tendientes al logro de un óptimo rendimiento productivo y turiones de elevada calidad. Para este cultivo se han difundido dos sistemas: el tradicional de arañas (STA) y el moderno de plántulas con cepellón (SMP). En el primer caso se requiere 1 año para la producción de las coronas. El segundo sistema permite optimizar el empleo del espacio disponible para el almácigo y realizar una mejor planificación de las plantaciones definitivas (Castagnino et al., 2011).

El mejoramiento del cultivo se orienta a una mayor producción, mejor calidad y adaptabilidad climática. La precocidad es de gran importancia para el consumo en fresco porque las altas temperaturas causan la apertura prematura de los extremos de los turiones, ramificándose y volviéndose no comerciables. La posibilidad de disponer material de espárrago de brotación uniforme permitirá lograr una producción concentrada, reduciendo el periodo de colecta con disminución del costo. Desde el punto de vista productivo, los caracteres más importantes son el número y peso promedio de los turiones, variables determinantes del rendimiento (Gatti et al., 2000; Asprelli et al., 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por raíces con suelo adherido y tallos de espárrago, bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de espárrago y coronas de espárrago cultivar UC-157 F2.

3.1.2 Población y muestra

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por las plantas de espárrago del fundo Josymar (50ha) en Virú, Trujillo y se investigó una muestra no probabilística de 96 plantas colectadas durante febrero-marzo de 2016. El número de muestras fue calculado (Vásquez et al., 2012), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada en un estudio piloto por los investigadores. En la investigación explicativa la población fueron los cultivos de bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de plantas de espárrago durante febrero-abril de 2016 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por cinco cultivos de bacterias seleccionadas.

3.2 Métodos

3.2.1 Variable de la fase descriptiva

Variable cuantitativa: Potencial como promotoras de crecimiento en plantas (nitrógeno fijado, fosfato solubilizado, indoles producidos).

3.2.2 Variables de la fase experimental

Variable independiente: Cultivos (5) de bacterias endófitas y rizosféricas.

Variable dependiente: Desarrollo vegetativo de plantas de espárrago (altura y número de tallos).

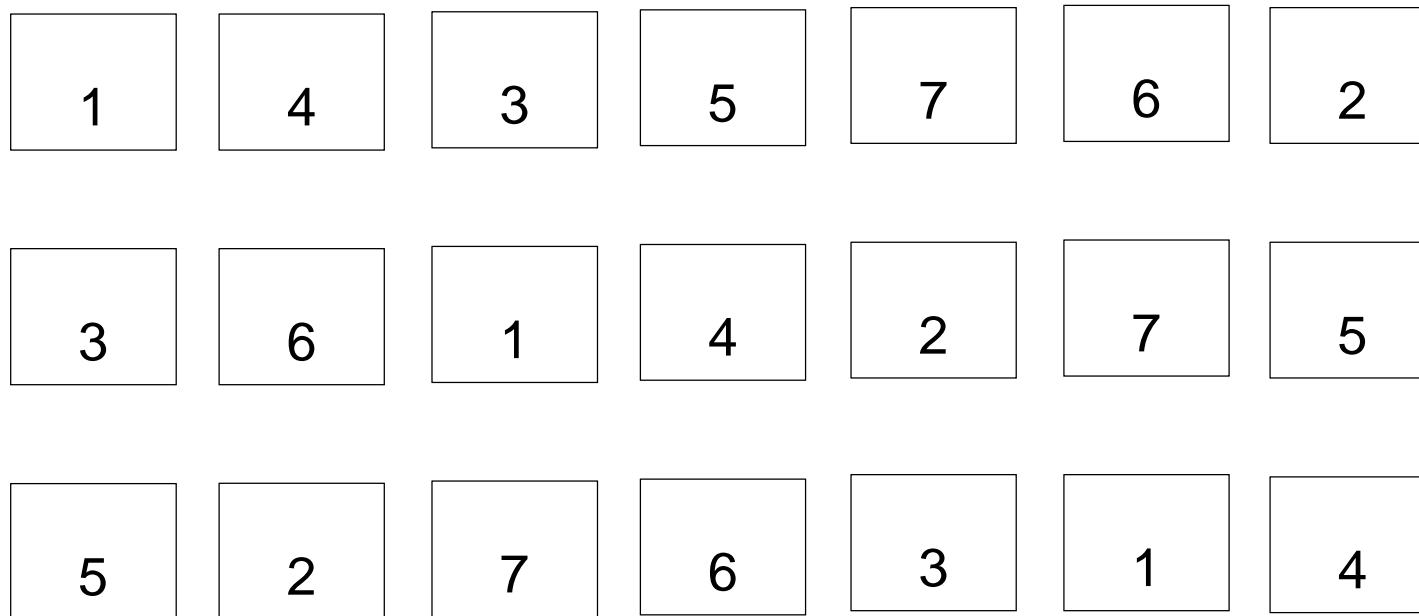
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase descriptiva correspondió al aislamiento e identificación de bacterias endófitas y rizosféricas, cuantificación de nitrógeno, fosfato solubilizado e indoles producidos. En la segunda fase experimental se determinó el efecto de cinco cultivos de bacterias en la altura y número de tallos de plantas de espárrago, durante 60 días, en invernadero.

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental de “Solo Después” (Vasquez et al., 2012) y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández et al., 2010). Los tratamientos fueron siete correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2: Testigo químico (urea 46% N), T3 a T6 bacterias endófitas y T7 bacteria rizosférica. En cada tratamiento se consideraron tres repeticiones, totalizando 21 unidades experimentales (Figura 1).

3.2.4 Lugar de muestreo

Las 96 muestras de raíces con suelo adherido y tallos de espárrago se colectaron en el fundo Josymar, ubicado en el lote 10,6 del sector IV, Proyecto Especial Chavimochic, en la provincia Virú, región La Libertad (Figura 2, tabla 1). Virú tiene una superficie de 3218,74 km² y limita por el norte con la provincia de Trujillo, por el este con las provincias de Julcán y Santiago de Chuco, por el sur con el Departamento de Ancash y por el oeste con el océano Pacífico (Municipalidad Provincial de Virú, 2016). El fundo Josymar tiene 50 ha, distribuidas en 24 lotes de aproximadamente 1,5 ha cada uno. Al momento del muestreo 19 lotes estaban sembrados con espárrago cultivar UC-157 F2 (cuatro plantas por metro lineal), con 1,8-2,5 años transcurridos después del transplante de coronas y una población promedio de 30 000 plantas ha⁻¹.



T1: Testigo absoluto

T2: Testigo químico

T3 – T6: Bacterias endófitas

T7: Bacteria rizosférica

Figura 1. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de bacterias endófitas y rizosféricas en el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L.



Figura 2. Plantas de *Asparagus officinalis* L. en Virú, región La Libertad, 2016.

Tabla 1. Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizósferico de *Asparagus officinalis* L. en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad

Lote	Nº de surcos	Nº de muestras
A1-B1-C1	54	15 (1-15)
A2-B2-C3	61	15 (16-30)
A3-B3-C3	62	15 (31-45)
A4-B4-C4	63	15 (46-60)
C5	56	5 (61-65)
A6-B6-C6	64	15 (66-88)
C7	49	5 (81-85)
C8	55	6 (86-91)
C9	51	5 (92-96)
Total: 19 lotes	515	96

3.2.5 Obtención de muestras

En el campo de cultivo de espárrago, cada cinco surcos se seleccionó la planta más vigorosa y se extrajeron aproximadamente 50g de raíces con suelo rizosférico y tallos adheridos (Figura 3), se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hacia el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo en Lambayeque.

En simultáneo al muestreo de raíces con suelo rizosférico de espárrago para el aislamiento de bacterias, se colectó una muestra representativa de 1kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es ligeramente ácido (pH 6,5) y ligeramente salino ($\text{CE } 3,06 \text{ dSm}^{-1}$), con textura arenosa, niveles bajos de materia orgánica (0,23%), nitrógeno (0,103ppm), fósforo disponible (6,0ppm) y potasio (203,0ppm).

3.2.6 Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno

Las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas se aislaron de raíces y tallos desinfectados superficialmente (Pérez et al., 2010; Altamirano et al., 2014). Las raíces y tallos se separaron de la corona, se lavaron con agua potable (Figuras 4, 5) para retirar el suelo adherido, se seleccionaron las diez raíces más engrosadas y se eliminaron los 2cm inferiores de los tallos. Para la desinfección raíces y tallos, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5cm, se pesaron 5g de cada uno, se depositaron independiente en frascos de 500mL de capacidad, con tapa, previamente esterilizados, para ser lavados con 50mL de agua destilada más detergente neutro 0,005% por 1 minuto y enjuagados por cuatro veces consecutivas con agua destilada esterilizada a razón 1 minuto por enjuague.



Figura 3. Extracción de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L.

Tabla 2. Análisis físico-químico de suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en Virú, La Libertad, 2016

Clase		CE	MO	N	P	K
textual	pH	(dSm ⁻¹)	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)
Arenosa	6,5	3,06	0,23	0,103	6,0	203,0



Figura 4. Fragmentos de raíces de *Asparagus officinalis* L.



Figura 5. Lavado de raíces de *Asparagus officinalis* L. con agua potable.

Después de la desinfección, las raíces se agitaron por 15 minutos en solución tampón de fosfato de potasio $0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7.0; se sometieron a inmersión por 1 minuto en alcohol 70% y agitación por 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 5% más Tween 80%. A continuación, el tejido fue llevado a nuevos frascos previamente esterilizados, para la inmersión por 1 minuto en alcohol 70%, seguido de agitación por 15 minutos en solución tampón y finalmente, lavado por cuatro veces con agua destilada esterilizada.

Para verificar la desinfección de la superficie de las raíces y tallos (Pérez et al., 2010), alícuotas del último lavado fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas a 30°C , por 48 horas. El tejido vegetal previamente desinfectado fue depositado en papel secante para eliminar el exceso de humedad (Figura 6) y luego fue llevado a bolsas de polietileno de $15 \times 16 \text{ cm}$, donde fue macerado y resuspendido en $0,5 \text{ mL}^{-1}$ de solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v), en caso de ser necesario (Figuras 7, 8). Con una jeringa se extrajo 1 mL, sembrándose inmediatamente una gota por doble puntura en los medios de cultivo semisólidos sin nitrógeno (Figuras 9, 10): NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha et al., 2009).

Después de la incubación a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta por 7 días, se seleccionaron los medios donde se observó una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del indicador (Figura 11) y se realizaron subcultivos en similares medios por dos veces consecutivas: primer y segundo subcultivo (Figura 12). Para el aislamiento de las bacterias endófitas, con la película bacteriana se obtuvo una suspensión en solución salina esterilizada y se sembró en los medios sólidos respectivos, incubando a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Los diversos morfotipos de las bacterias aisladas se cultivaron nuevamente en medio semisólido (tercer subcultivo) y posteriormente en el medio sólido correspondiente contenido en placa de Petri y luego en vial.



Figura 6. Fragmentos de raíces de *Asparagus officinalis* L. en papel secante esterilizado.

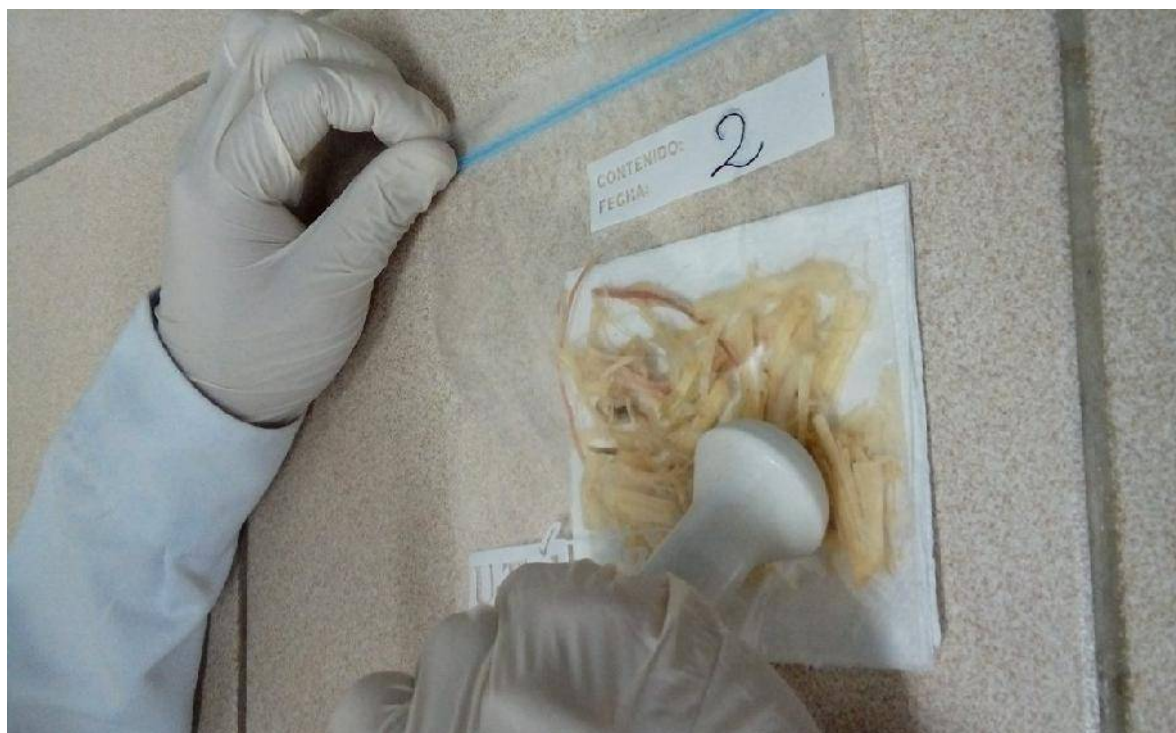


Figura 7. Macerado de raíces de *Asparagus officinalis* L. desinfectadas.



Figura 8. Separación del macerado de *Asparagus officinalis* L.

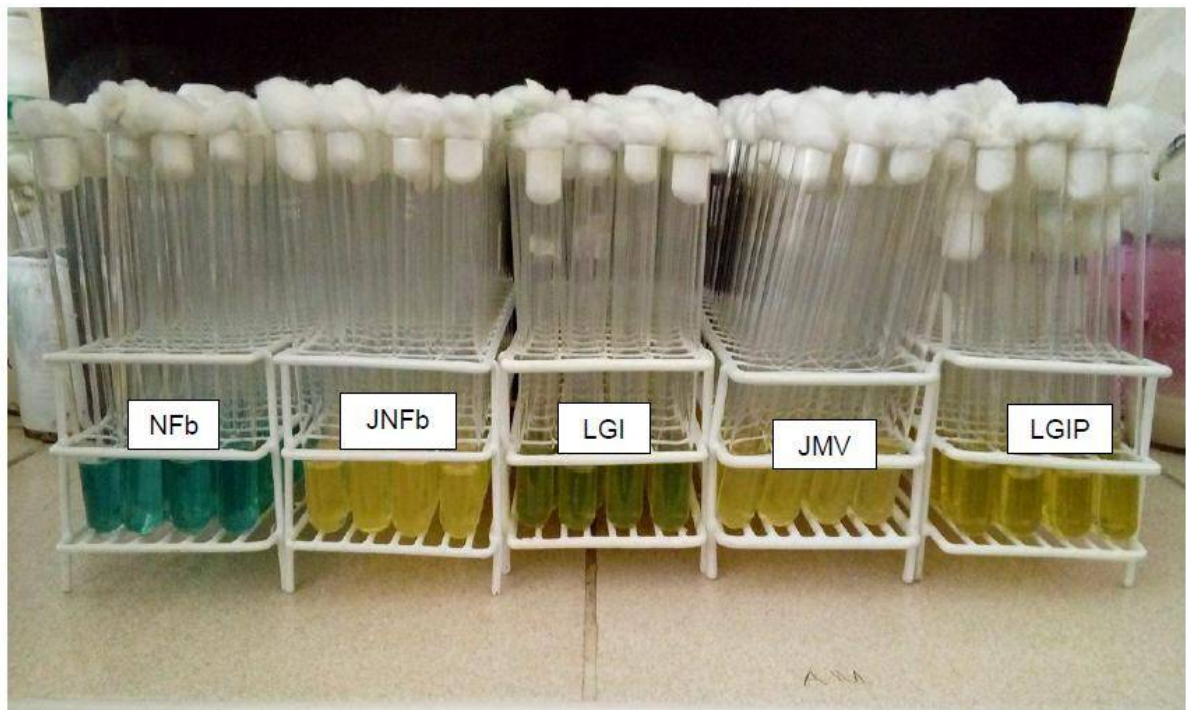


Figura 9. Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.



Figura 10. Siembra del macerado de raíces de *Asparagus officinalis* L. en medio semisólido sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias endófitas.



Figura 11. Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos.

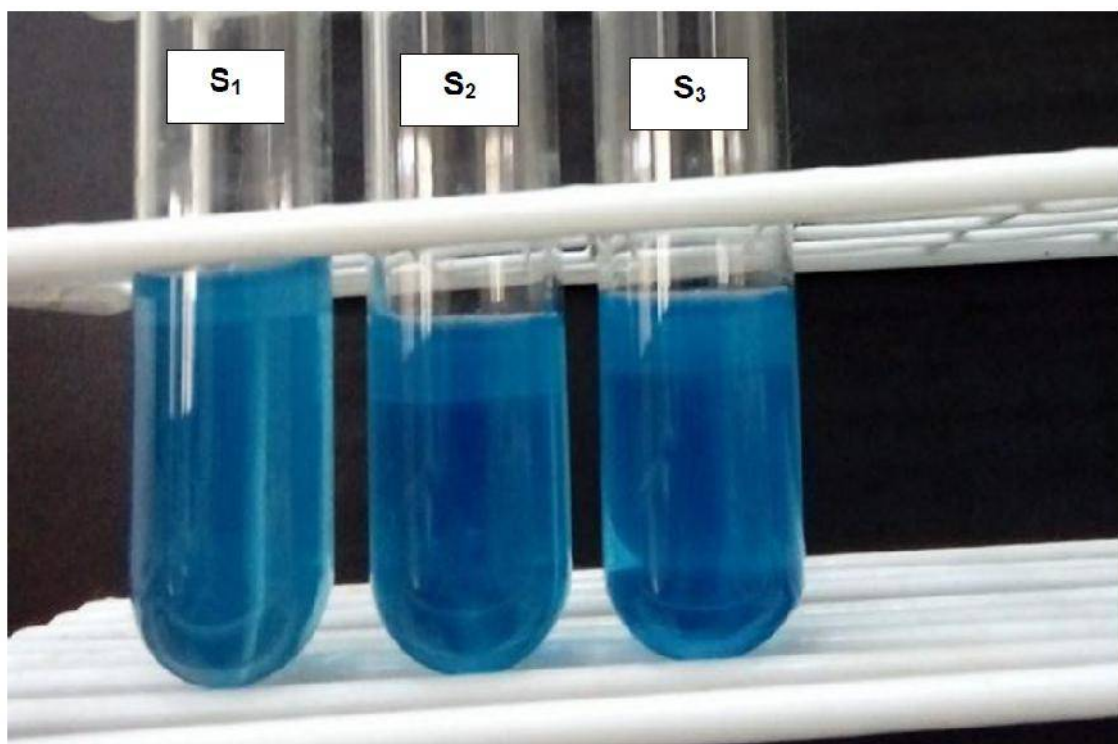


Figura 12. Subcultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medios semisólidos.

Con las colonias de las bacterias se realizaron tinciones de Gram y se cultivaron en agar nutritivo y medios sólidos sin nitrógeno, constituyendo los cultivos puros de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, que se guardaron en refrigeración (8°C).

3.2.7 Aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno

Las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias y microaerófilas se aislaron (Garrido, 2007; Altamirano et al., 2014) de las raíces con suelo rizosférico (Figura 13), previamente deshidratadas bajo sombra, durante 72 horas. Las raíces fueron fragmentadas (5 cm), aleatoriamente se tomaron 10 g de raíces junto con el suelo adherido y se depositaron en frascos de 250 mL de capacidad, conteniendo 90 mL de solución salina esterilizada NaCl 0,85% p/v.

Después de agitar manualmente durante 10 minutos los frascos conteniendo la suspensión de raíces y suelo en solución salina (Figura 14) se tomaron alícuotas y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie de medios sólidos sin nitrógeno para aislar bacterias aerobias y mediante la técnica de puntura en medios semisólidos sin nitrógeno (una gota por tubo) para aislar bacterias microaerófilas (Anexo 2). Ambos medios sólidos y semisólidos sin nitrógeno fueron suplementados con antimicótico.

Las bacterias aerobias fueron aisladas en los medios de cultivo sólidos LG para *Azotobacter*, LGD para *Derxia* y BEIJ para *Beijerinckia* spp. (Garrido, 2007; Jha et al., 2009). Después de la incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 días, con los morfotipos de las bacterias representativas se obtuvieron suspensiones en solución salina esterilizada y se sembraron en los medios sólidos respectivos y posteriormente en agar batata.

Los medios de cultivo semisólidos para bacterias microaerófilas fueron NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha et al., 2009; Marra et al., 2012).



Figura 13. Raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. deshidratadas.



Figura 14. Suspensión de raíces y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en solución salina esterilizada.

3.2.8 Identificación fenotípica de bacterias endófitas y rizosféricas

La identificación del género de las bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas según el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativo (Holt et al., 1994; Schoebitz, 2006; Garrido, 2007). Con todas las bacterias se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa y motilidad.

Para la identificación de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* se investigó la utilización de glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno. Adicionalmente para *Azospirillum* se realizaron pruebas de hidrólisis de urea, gelatina y reducción de nitratos; para *Herbaspirillum* pruebas de hidrólisis de urea y crecimiento de caldo NFb; para *Gluconacetobacter* pruebas de hidrólisis de urea, gelatina, almidón y reducción de nitratos y para *Burkholderia* pruebas de hidrólisis de gelatina, descarboxilación de lisina y resistencia a la Polimixina B (Altamirano et al., 2014). Con las bacterias aerobias del género *Azotobacter*, las pruebas fueron acidificación de glucosa, sacarosa, maltosa y fructosa y para los géneros *Derxia* y *Beijerinckia* producción de Indol, utilización del citrato como fuente de carbono, crecimiento en 1% de agua peptonada y acidificación de glucosa, sacarosa y manitol.

3.2.9 Mantenimiento de cultivos de bacterias

Los cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas y rizosféricas identificados se sembraron en el medio sólido y semisólido sin nitrógeno correspondiente y en agar nutritivo (Figura 15) y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C) y refrigeración (8°C), respectivamente, realizándose subcultivos cada 30 días (Altamirano et al., 2014).



Figura 15. Cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno.

3.2.10 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos

Con las bacterias endófitas y rizosféricas aisladas e identificadas se cuantificó el amonio, producto de la fijación de nitrógeno, el fósforo soluble producto de la solubilización de fosfatos y los indoles producidos. Para la obtención del inóculo, cada bacteria se cultivó en 5mL de caldo nutritivo a 30°C, durante 24 horas (Córdova, 2016). Posteriormente, el caldo se centrifugó (3500 rpm) durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó en solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v) y su concentración se estandarizó por turbidimetría a 9×10^8 cel mL⁻¹ (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland).

a. Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

La cuantificación del amonio producto de la fijación de nitrógeno *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de Berthelot o fenol hipoclorito (Lara et al., 2007; Cadena & Martínez, 2011). El inóculo (5%:0,15 mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en tubos de 15x150 mL conteniendo 3 mL de caldo extracto de suelo 10% (Figura 16, anexo 3) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, con agitación constante (150 rpm). A continuación, se agregaron 9 mL de KCl 2M, se agitaron a 150 rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo por 1 hora adicional, para después tomar 10 mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000 rpm) durante 5 minutos.

Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución, se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1 mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno *in vitro* por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm. Las concentraciones de amonio se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio (Anexo 3).



Figura 16. Caldo extracto de suelo cultivado con bacterias endófitas y rizosféricas.

b. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

La cuantificación de fósforo soluble producto de la solubilización de fosfatos *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de molibdato (Alvarado & Valderrama, 2014). El inóculo (5%:1 mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en 5mL de caldo National Botanical Research Institute's phosphate NBRIP (Figura 17, anexo 4) y se incubaron a 30°C, con agitación constante (150rpm), por 96 horas. Después, los caldos se centrifugaron (3000 rpm) durante 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble (Rodier & Rodi, 2005), considerándose una coloración azul positiva a la solubilización del fosfato. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible a 690 nm y las concentraciones de fósforo soluble se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 10ppm de fósforo (Anexo 4).

c. Cuantificación de indoles producidos *in vitro*

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* se realizó según la reacción colorimétrica de Salkowski (Mantilla, 2007; García & Muñoz, 2010). El inóculo (5%:0,25 mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Figura 18, anexo 5). Después de la incubación a 30°C, por 72 horas en agitación constante (150 rpm), los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm, durante 5 minutos. A continuación, 0,4 mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6 mL del reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se consideró positiva a la producción de indoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530 nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución 100ppm de ácido indolacético.



Figura 17. Caldo National Botanical Research Institute's phosphate.



Figura 18. Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con bacterias endófitas y rizosféricas.

3.2.11 Selección de bacterias endófitas y rizosféricas

Los cultivos de bacterias seleccionadas para la fase experimental de la investigación fueron cinco, correspondientes a los valores máximos en la concentración de amonio (dos cultivos de bacterias endófitas aisladas de raíz y tallo) y mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles (dos cultivos de bacterias endófitas aisladas de raíz y tallo y una rizosférica aerobia).

3.2.12 Efecto de bacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago

Los cinco cultivos de bacterias endófitas y rizosféricas seleccionados se inocularon en coronas de espárrago (Figura 19), determinándose, durante 60 días el efecto en el desarrollo vegetativo de las plantas, en condiciones de invernadero.

El suelo experimental estuvo constituido por 90kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus en la proporción 2:1:1, que fue distribuido en macetas de arcilla de 7kg de capacidad, a razón de 4kg por maceta. El cultivo de espárrago y la inoculación de las bacterias se realizó entre el 12 de diciembre al 13 de febrero de 2017, registrándose las temperaturas máxima (29°C), mínima (21°C) y media (25°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicado en el fundo “El Cienago” de Lambayeque (Anexo 6).

En el ensayo se sembraron coronas de espárrago cultivar UC-157 F2, con un peso promedio de 60g (55-65g) luego de ser tratadas por inmersión durante 5 minutos (Figuras 20), en una solución del fungicida Benomyl polvo mojable-WP (Benlate), en la dosis de 2g L⁻¹ de agua declorada previamente durante 24 horas. El cultivar UC-157 fue obtenido en 1980 en Estados Unidos (Farías et al., 2004). Es específico para la producción de turiones verdes. Se comercializan los híbridos F1 y F2 y son los más precoces y productivos del mercado (Delgado, 2007).



Figura 19. Coronas de *Asparagus officinalis* L.



Figura 20. Inmersión de coronas de *Asparagus officinalis* L. en solución de fungicida.

El inóculo fue obtenido con bacterias cultivadas en caldo nutritivo, a 30°C, durante 24 horas y después de la centrifugación se obtuvieron 500mL de cada cultivo bacteriano en solución salina esterilizada, NaCl 0,87% p/v (Figura 21), cuya concentración se estandarizó a 9×10^8 cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland).

Transcurridos 30 minutos del tratamiento con fungicida, las coronas de espárrago se asperjaron con el inóculo bacteriano (100mL por corona), con ayuda de un pulverizador de plástico de 500mL de capacidad (Figura 22). Después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiental (25°C), se sembraron en el suelo experimental, a razón de una corona por maceta. Los riegos se realizaron cada 2 días con agua potable decolorada, tomando en cuenta los requerimientos hídricos de las plantas. Después de 15 días de la siembra, en el testigo químico se aplicaron 250mL de una solución de fertilizante nitrogenado (Urea 46%), en la dosis de 5g L⁻¹ de agua, cada 30 días.

Transcurridos 30, 45 y 60 días después de la siembra, se midió la altura de las plantas y se contaron los tallos. La altura se expresó en cm, considerando desde la base del tallo más alto hasta la yema terminal (Puicón, 2014). Con los valores de altura y número de tallos se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula (Carreño, 2009) siguiente:

$$IEI (\%) = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

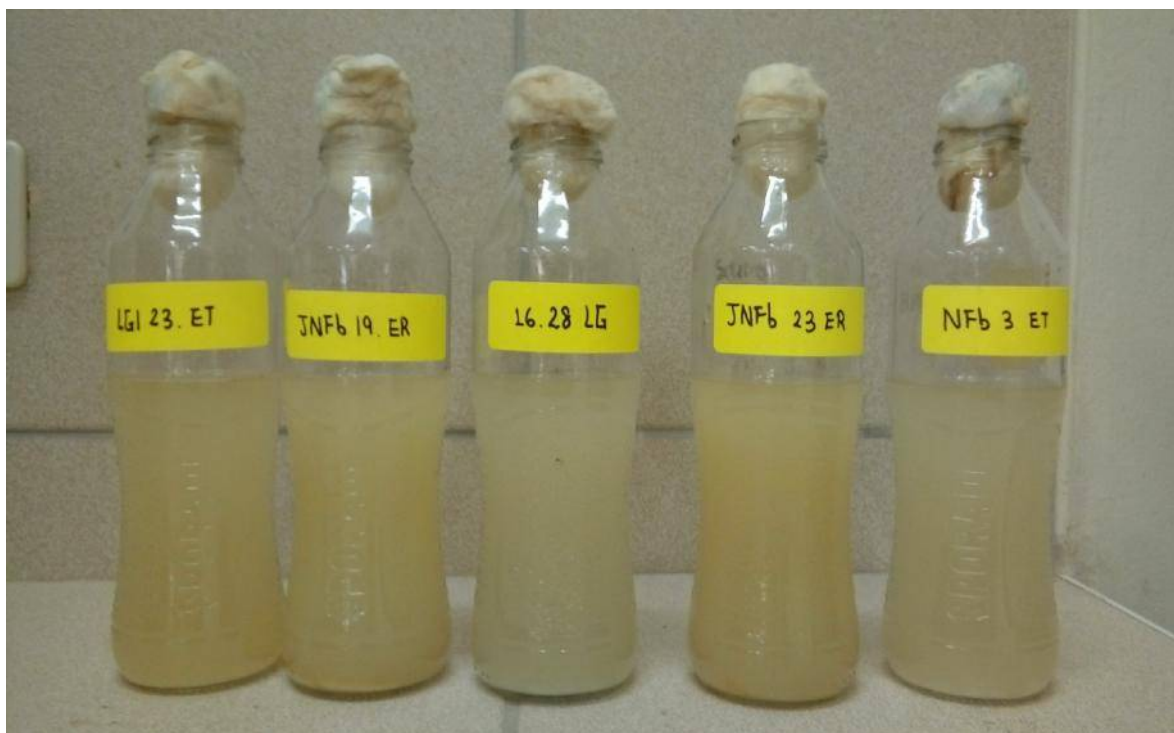


Figura 21. Inóculo de bacterias endófitas y rizosféricas en solución salina esterilizada.



Figura 22. Inóculo bacteriano asperjado en corona de *Asparagus officinalis* L.

3.2.13 Análisis estadístico de los datos

Para el diseño experimental completamente aleatorio, el modelo aditivo lineal fue:

$$Y_{ij} = u + t_i + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = observación del i -ésimo tratamiento, j -énésima repetición

u = media general de la variable respuesta.

t_i = efecto i -ésimo tratamiento, siendo $i = 1, 2, 3, \dots, 7$

E_{ij} = error experimental en el i -ésimo tratamiento, j -ésima repetición

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3, \dots = u_7$

H_a = al menos una media diferente

Con los valores de altura y número de tallos de las plantas se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza y según los resultados se llevaron a cabo análisis paramétricos y no paramétricos (Hernández et al., 2010). En el presente trabajo se utilizó el software estadístico SPSS versión 15,0 así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2010 y Minitab 15.

IV. RESULTADOS

4.1 Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno se aislaron de raíces y tallos de espárrago, en cinco medios de cultivo semisólidos sin nitrógeno, en los que se evidenciaron por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y el viraje del indicador (Figuras 23 a 27). En el medio NFb, con un color inicial celeste-verdoso, se observó viraje del indicador al celeste-azulado. La frecuencia de muestras de raíces de espárrago positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 97,9% después de la siembra, así como 77,1; 63,5 y 33,3% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 28). En tallos la frecuencia fue de 96,8; 81,2; 69,7 y 63,5%, respectivamente (Figura 29).

En el medio LGI, con un color inicial verde, se observó viraje del indicador al amarillo. La frecuencia de muestras de raíces de espárrago positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 63,5% después de la siembra, así como 44,7; 30,2 y 21,9% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 30). En tallos la frecuencia fue de 78,1; 64,5; 50,0 y 44,7%, respectivamente (Figura 31).

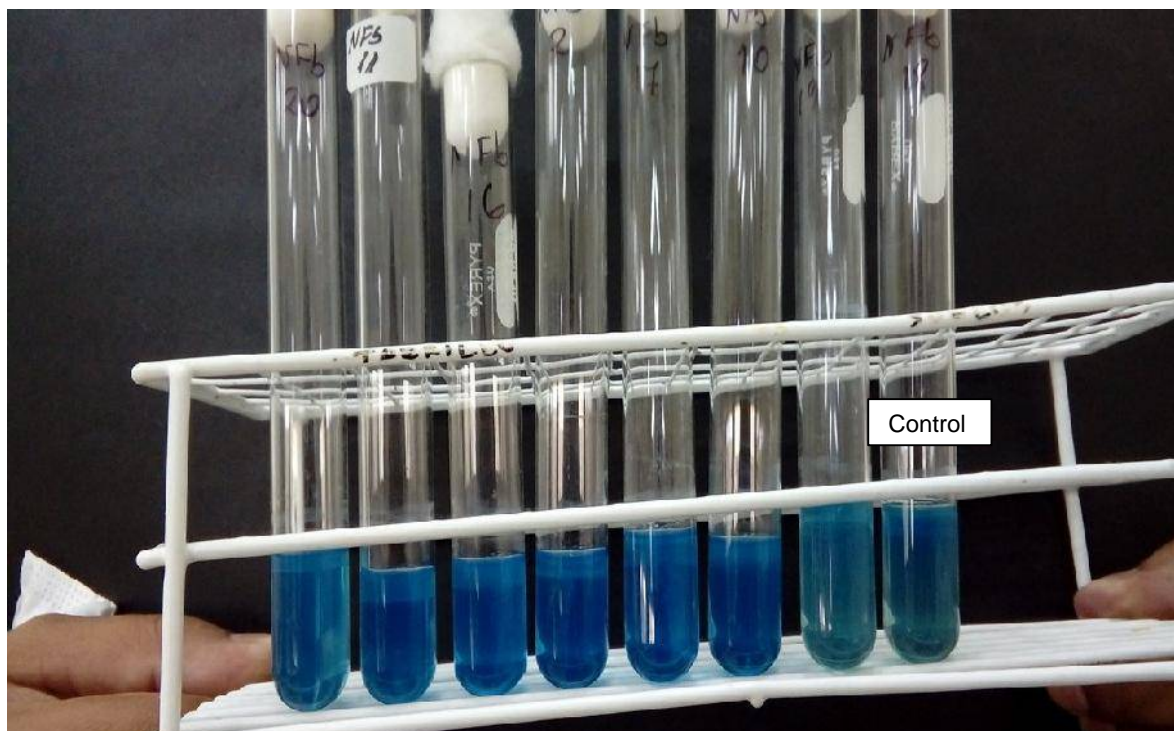


Figura 23. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio NFb.

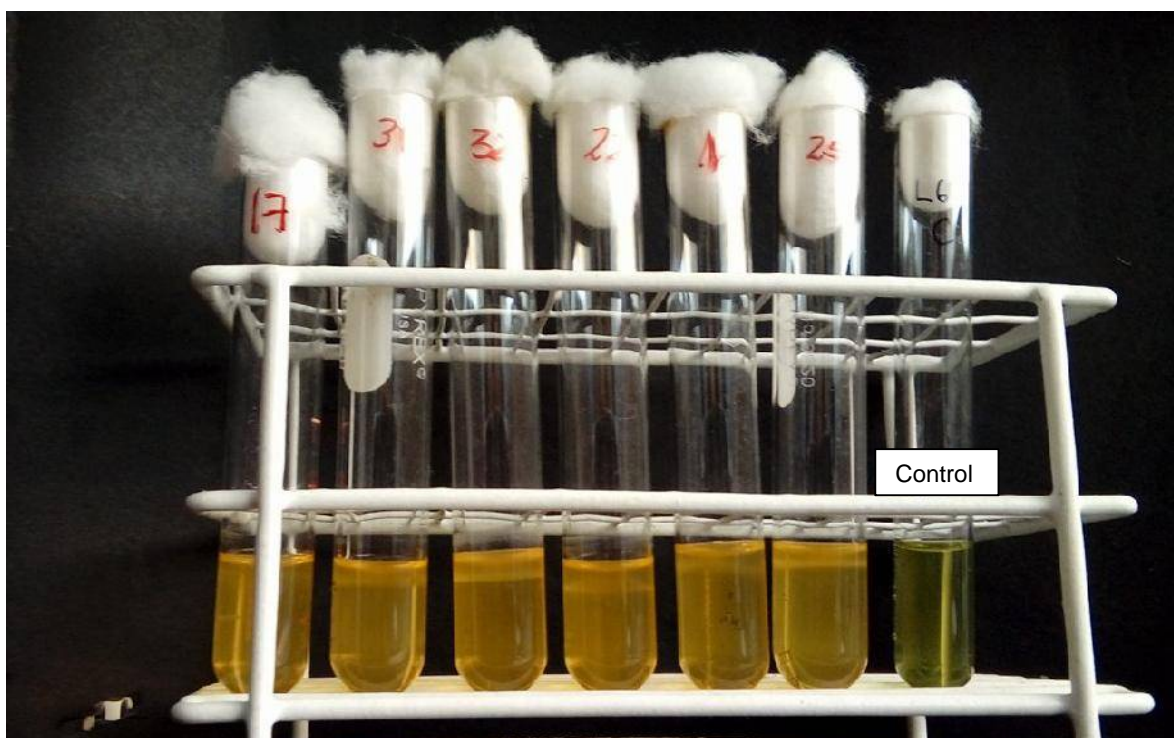


Figura 24. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGI.



Figura 25. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGIP.

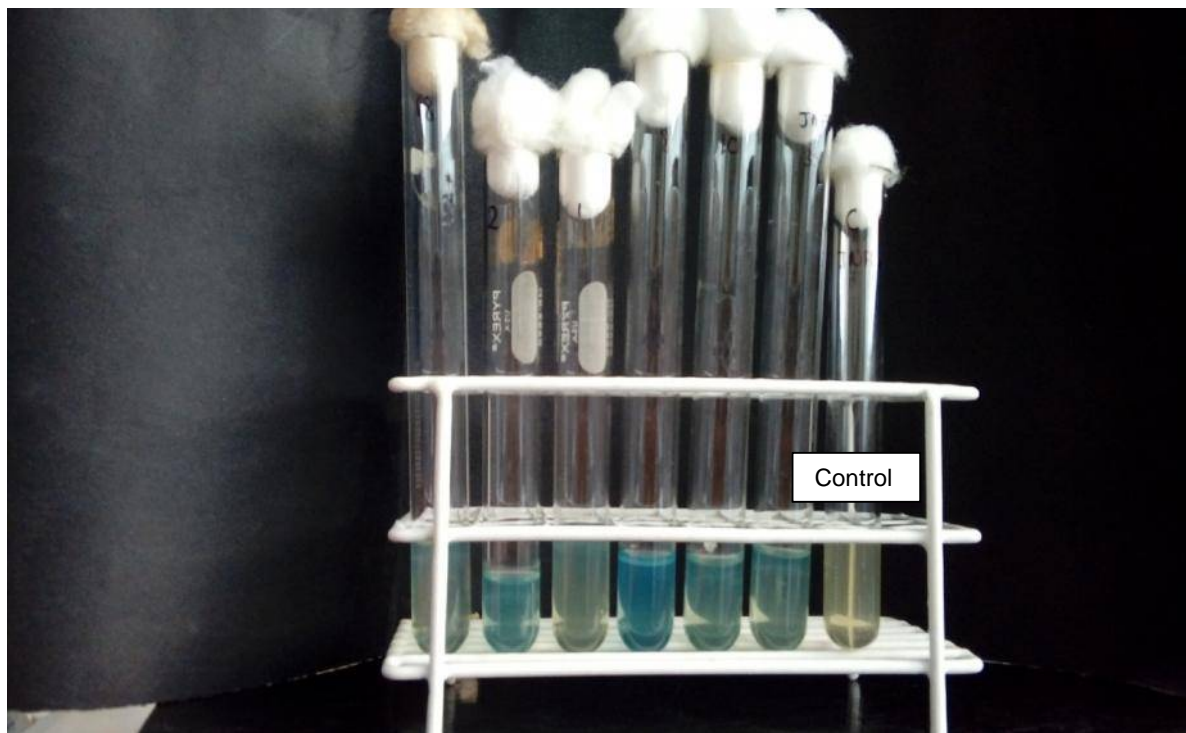


Figura 26. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio JNFb.



Figura 27. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio JMV.

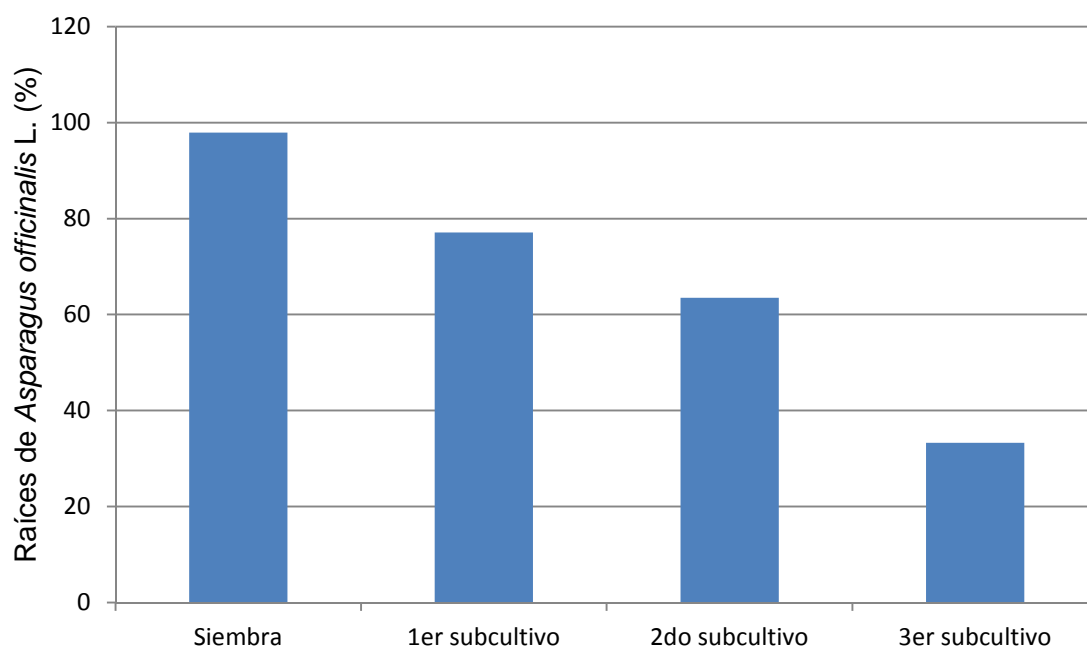


Figura 28. Frecuencia de raíces de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

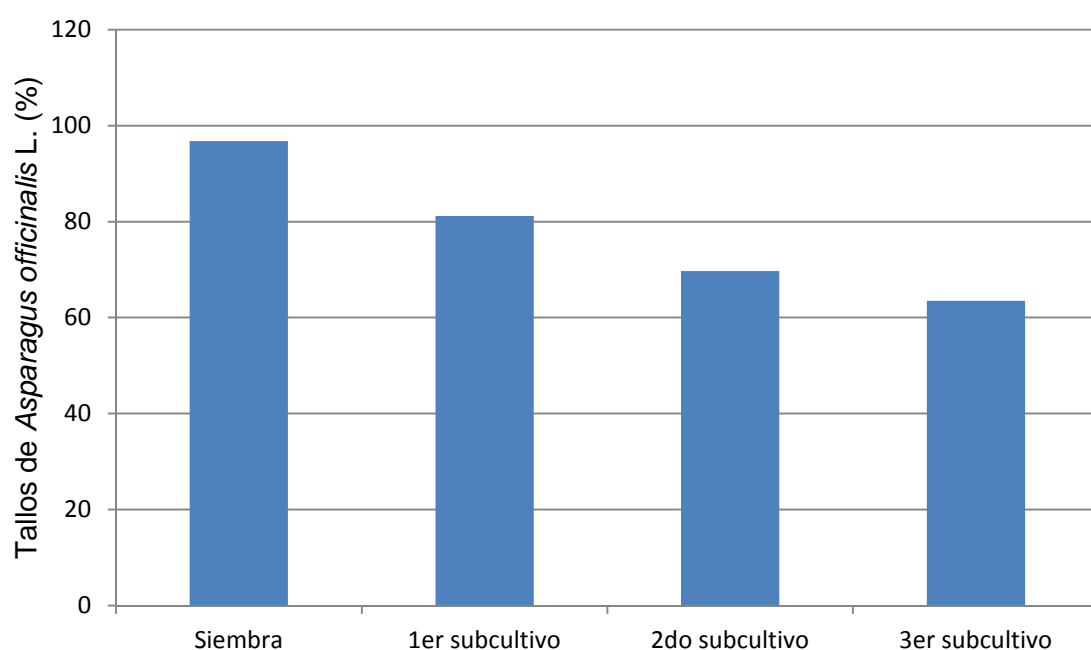


Figura 29. Frecuencia de tallos de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

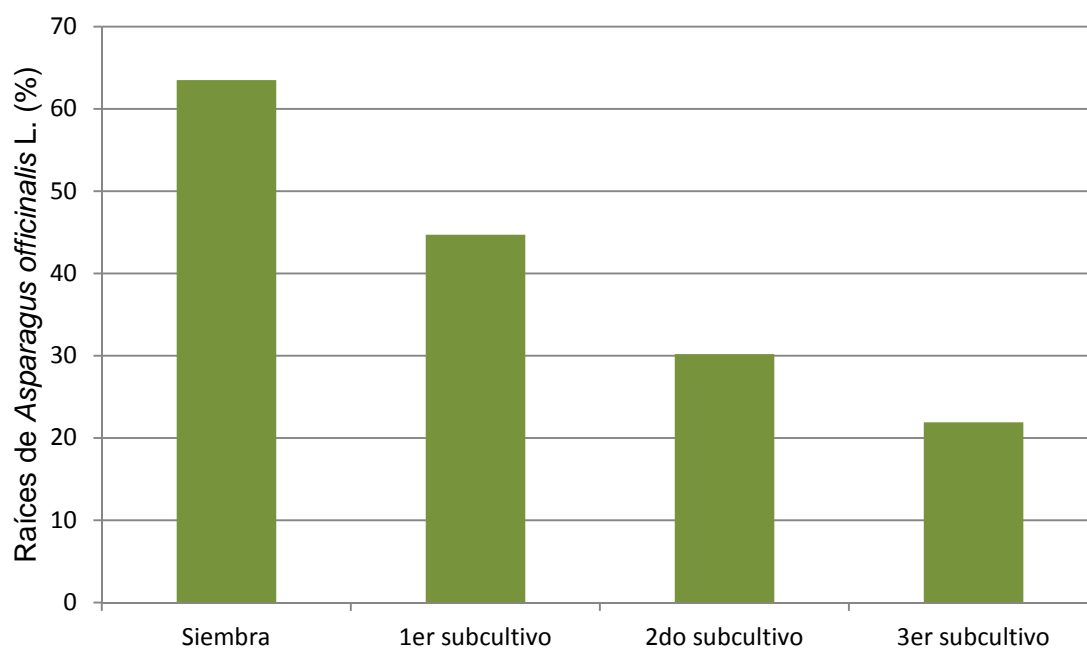


Figura 30. Frecuencia de raíces de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

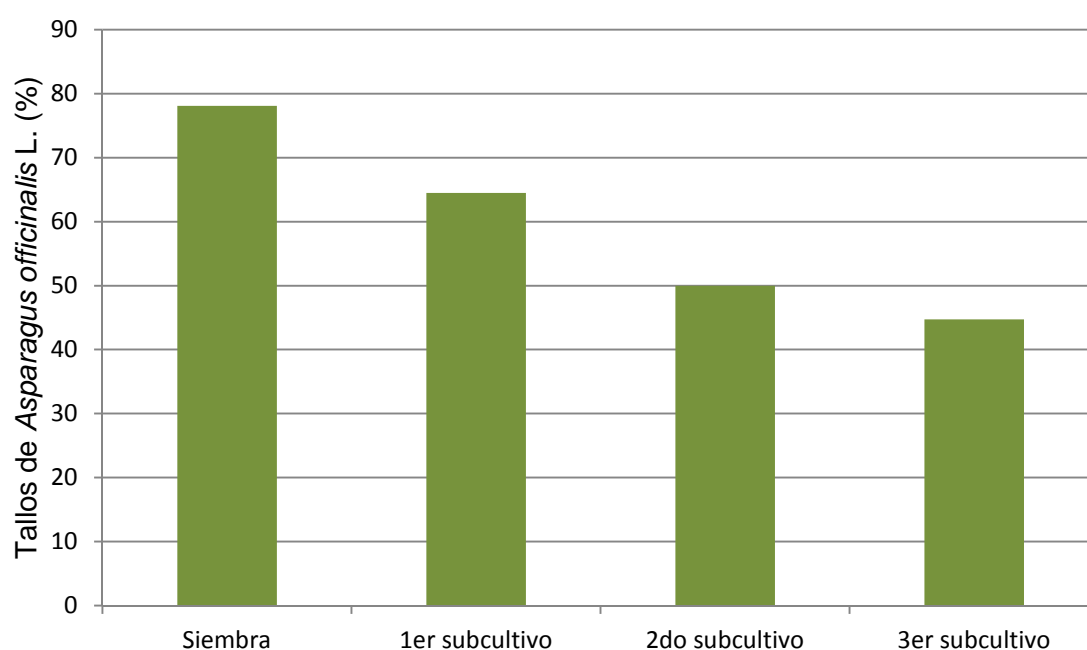


Figura 31. Frecuencia de tallos de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

En el medio LGI-P, con un color inicial verde-amarillento, se observó viraje del indicador al amarillo. La frecuencia de muestras de raíces de espárrago positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 58,3 %; después de la siembra, así como 47,9; 35,4 y 25,0 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 32).

En el medio JNFb, con un color inicial amarillo, se observó viraje del indicador al celeste-azulado. La frecuencia de muestras de raíces de espárrago positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 71,8%; después de la siembra, así como 58,3; 41,6 y 28,1% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 33). En tallos la frecuencia fue de 72,9; 56,2; 46,8 y 38,5%, respectivamente (Figura 34).

En el medio JMV, con un color inicial amarillo opaco, no se observó viraje del indicador. La frecuencia de muestras de raíces de espárrago positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 66,6%; después de la siembra, así como 52,0; 36,4 y 25,0% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 35). En tallos la frecuencia fue de 75,0; 58,3; 46,8 y 36,4%, respectivamente (Figura 36).

La frecuencia de muestras de raíces de espárrago con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno después de tres subcultivos fue 33,3% (32) en NFb; 28,1% (27) en JNFb; 25% (24) en JMV; 25% (24) en LGIP así como 21,9% (21) en LGI (Figura 37). En el aislamiento se obtuvieron 80 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno (Figuras 38, 39), cuya procedencia correspondió al 25% (20) en NFb; 21,25% (17) en JNFb; 18,75% (15) en JMV; 18,75% (15) en LGIP y 16,25% (13) en LGI (Figura 40).

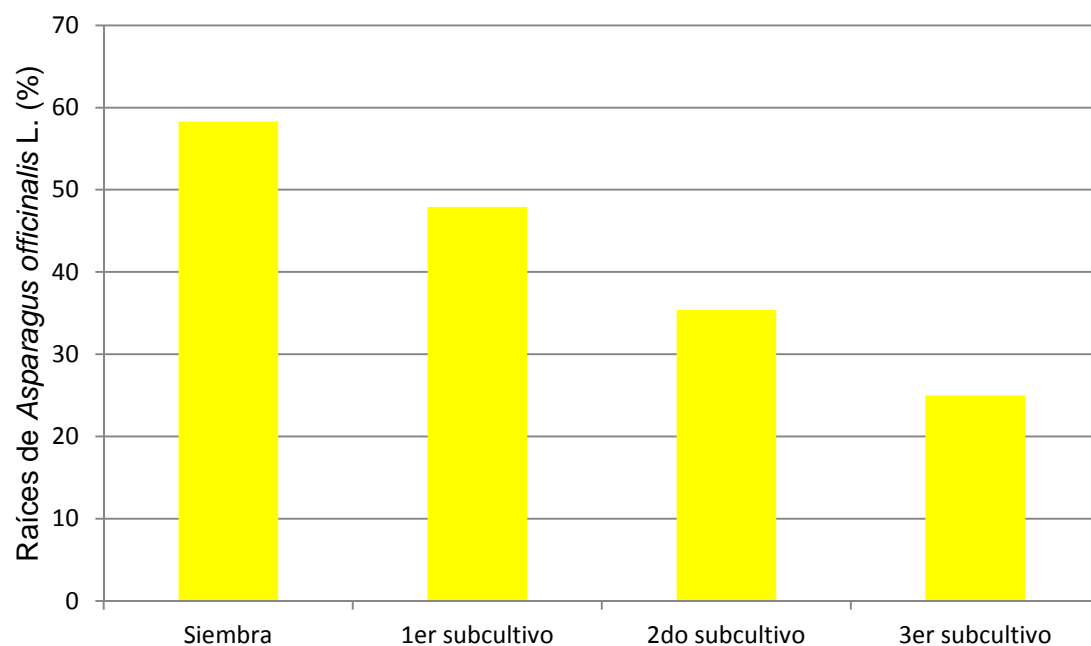


Figura 32. Frecuencia de raíces de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGIP después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

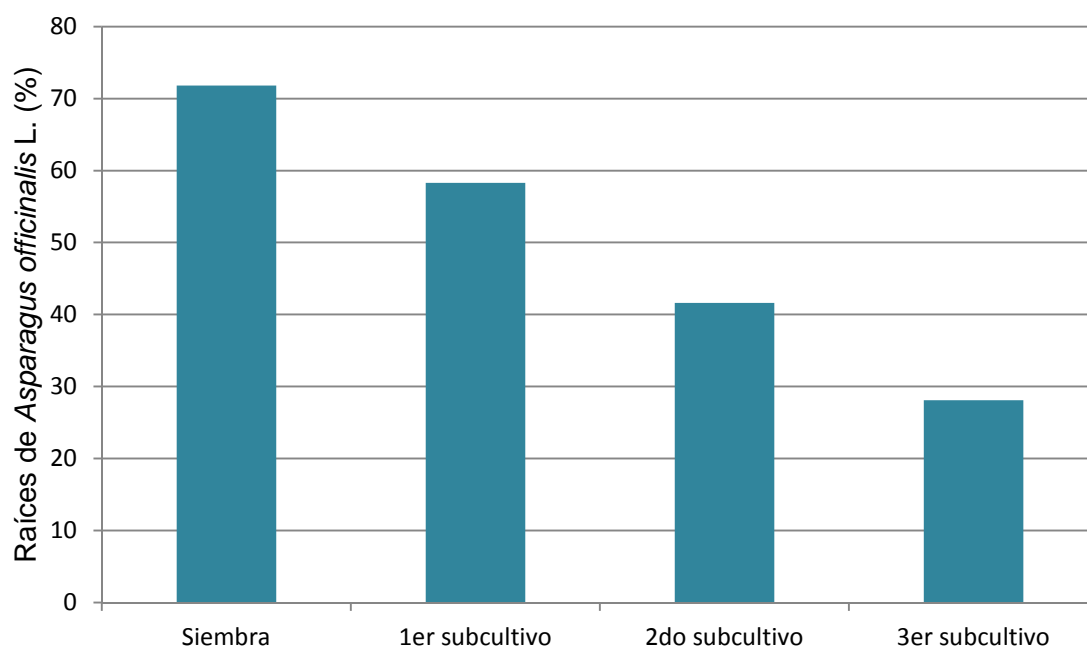


Figura 33. Frecuencia de raíces de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

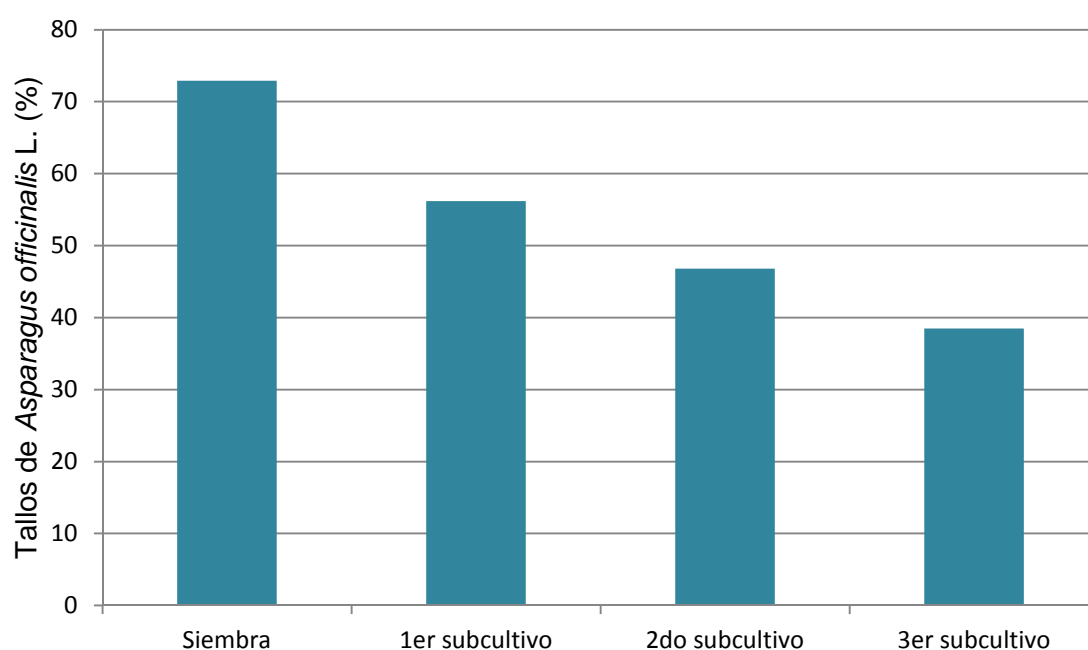


Figura 34. Frecuencia de tallos de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

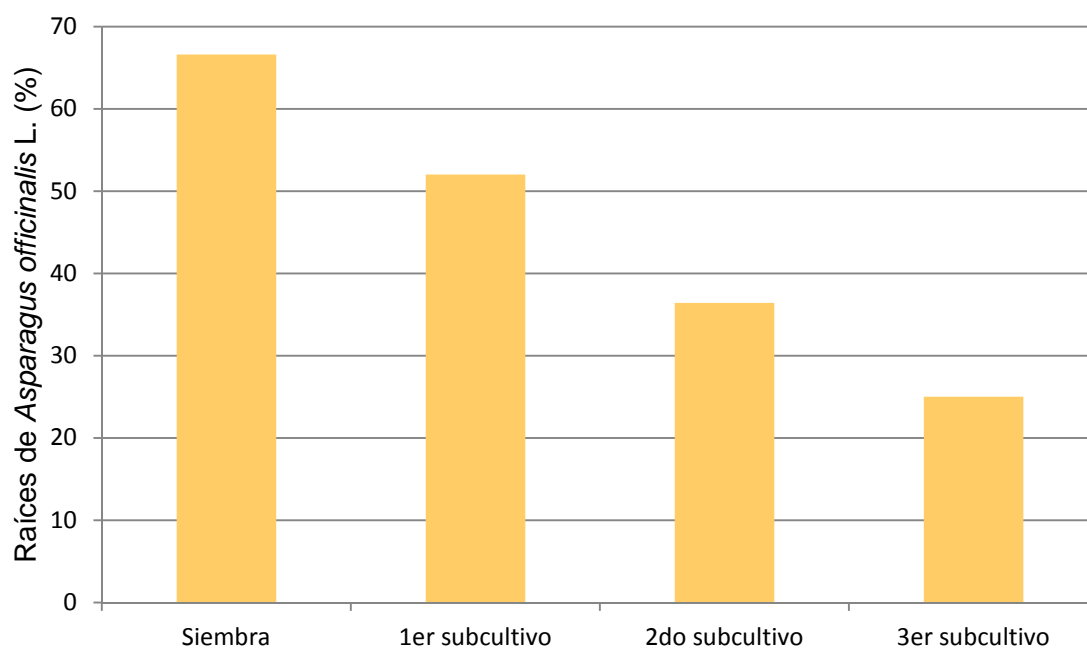


Figura 35. Frecuencia de raíces de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

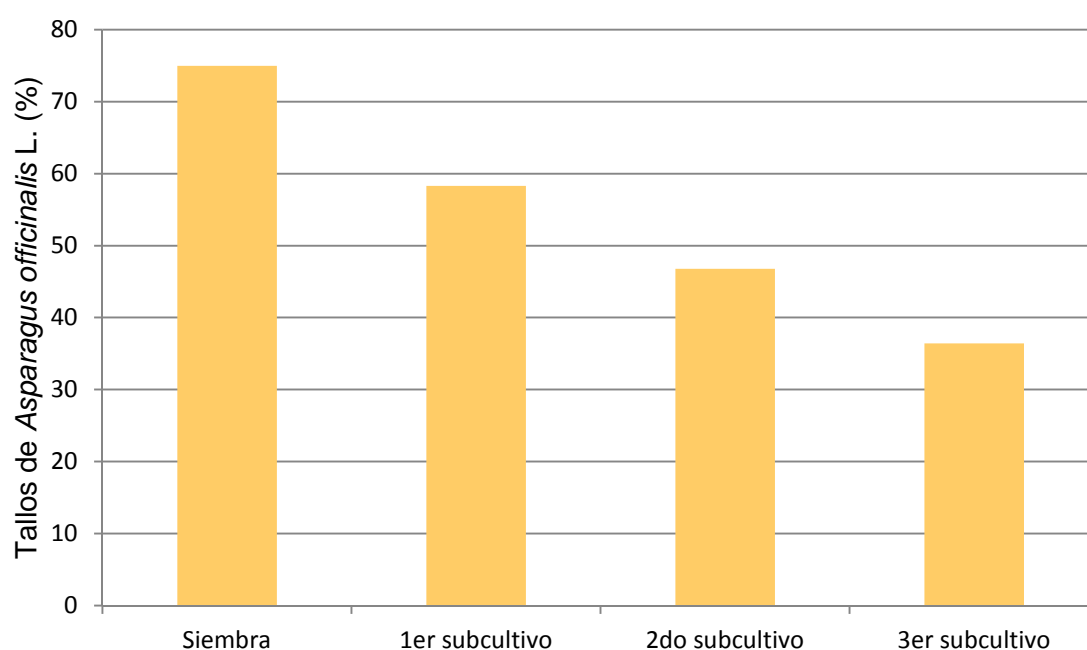


Figura 36. Frecuencia de tallos de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

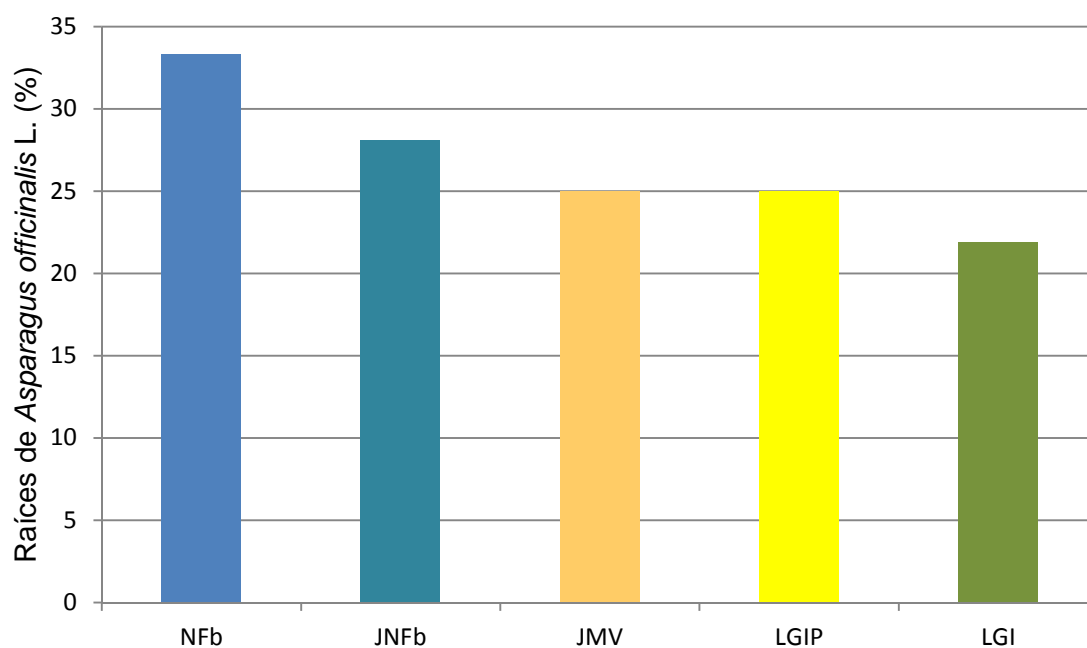


Figura 37. Frecuencia de raíces de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.



Figura 38. Cultivos puros en agar nutritivo de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno provenientes de raíces.

La frecuencia de muestras de tallos de espárrago con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno después de tres subcultivos fue 63,5% (61) en NFb; 44,7% (43) en LGI; 38,5% (37) en JNFb y 36,4% (35) en JMV (Figura 41). En el aislamiento se obtuvieron 110 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya procedencia correspondió al 34,5% (38) en NFb; 24,5% (27) en LGI; 21% (23) en JNFb y 20% (22) en JMV (Figura 42). En este contexto, el 95,8% (92) de muestras de raíces y tallos de espárrago resultaron positivas al aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, obteniéndose 190 cultivos puros.

4.2 Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno se aislaron del suelo de la rizósfera de espárrago. En tres medios de cultivo sólidos sin nitrógeno se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias, cuya presencia se evidenció por las colonias desarrolladas (Figuras 43, 44, 45) y el viraje del indicador al amarillo. En el medio LGD, con un color inicial amarillo-verdoso se observó viraje del indicador al celeste-verdoso. Los medios LG, con un color celeste y *Beijerinckia* crema-opaco mantuvieron su color inicial.

La frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de espárrago con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias fue 78,1% (75) en LGD; 56,2% (54) en LG y 50% (48) en el medio *Beijerinckia* (Figura 46). En el aislamiento se obtuvieron 111 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias (Figura 47), cuya procedencia correspondió al 42,3% (47) en LGD; 30,7% (34) en LG y 27% (30) en medio *Beijerinckia* (Figura 48).

En cuatro medios de cultivo semisólido se aislaron bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas, cuya presencia se evidenció por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y el viraje del indicador (Figuras 49, 50).

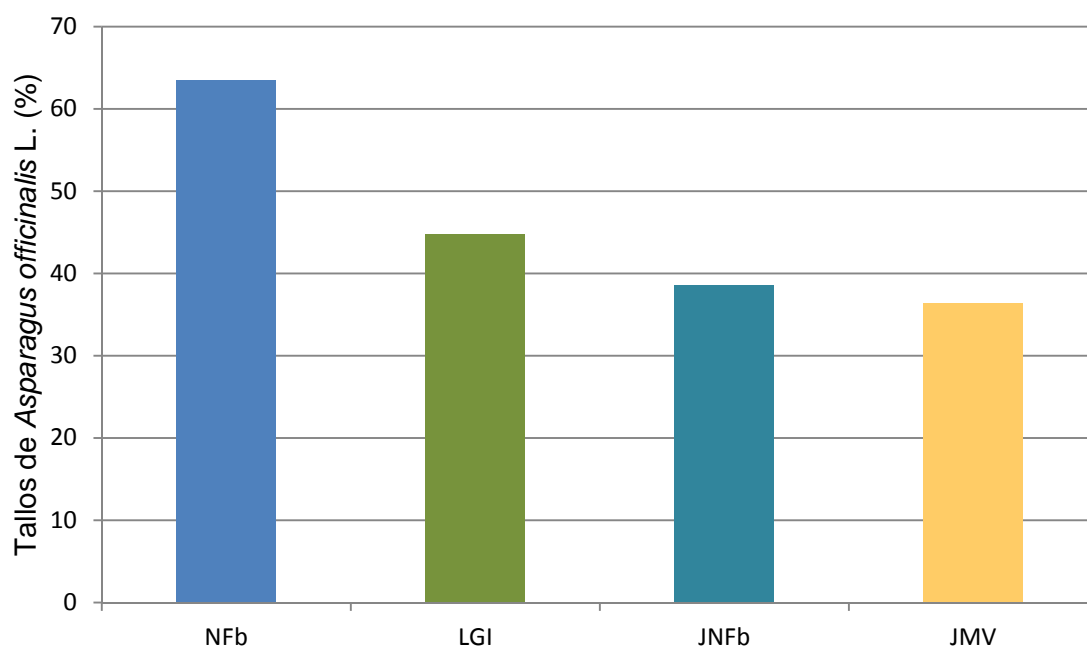


Figura 41. Frecuencia de tallos de *Asparagus officinalis* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.

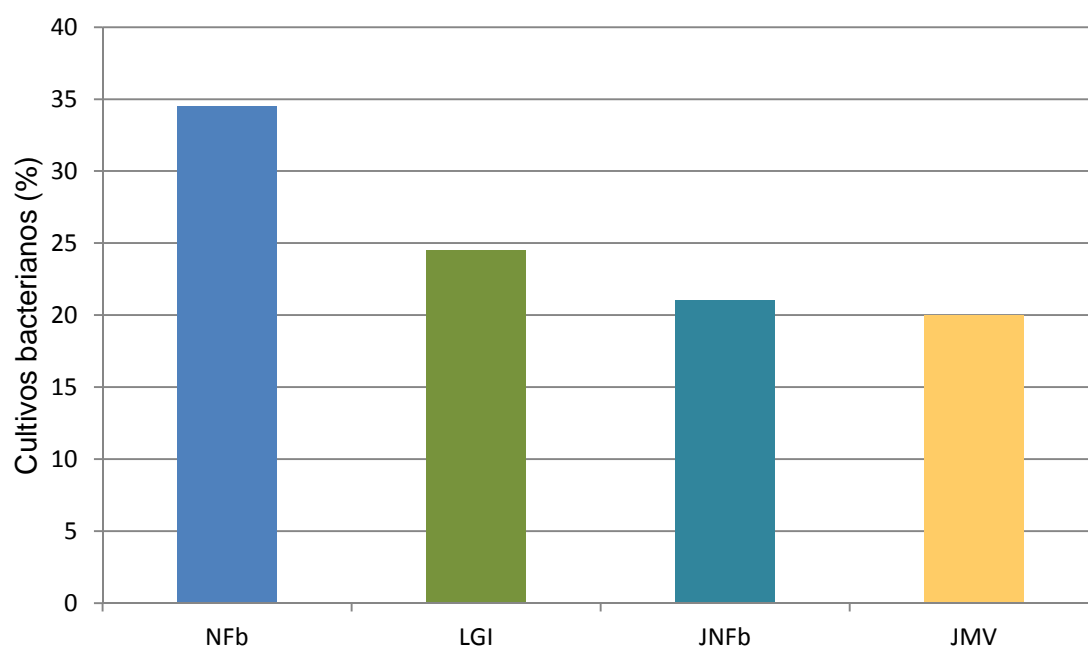


Figura 42. Porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de tallos de *Asparagus officinalis* L. en cinco medios semisólidos.

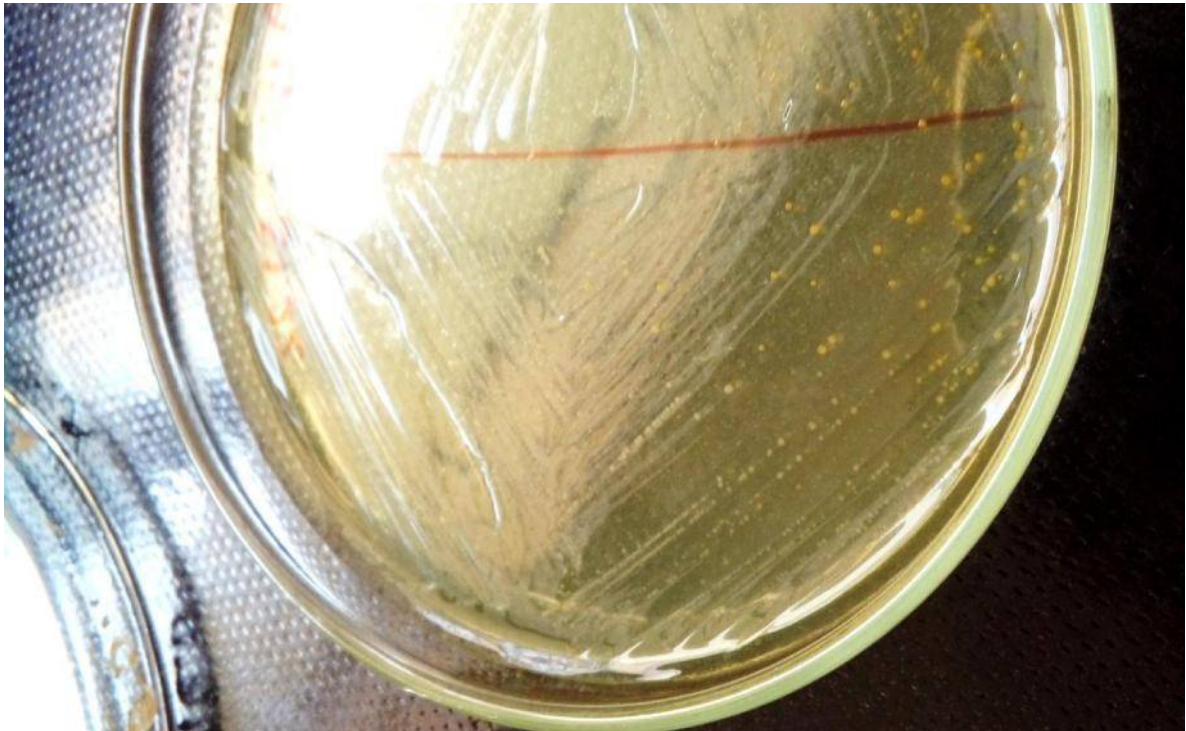


Figura 43. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio LGD.



Figura 44. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio LG.

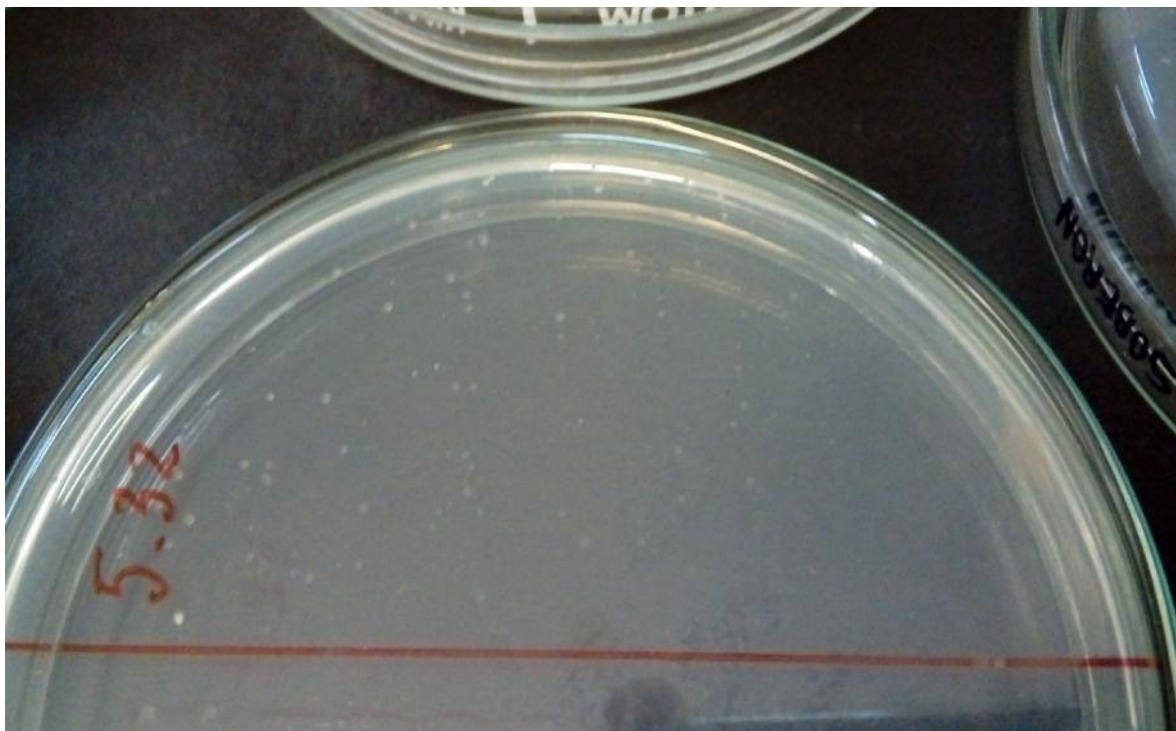


Figura 45. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio Beijerinckia.

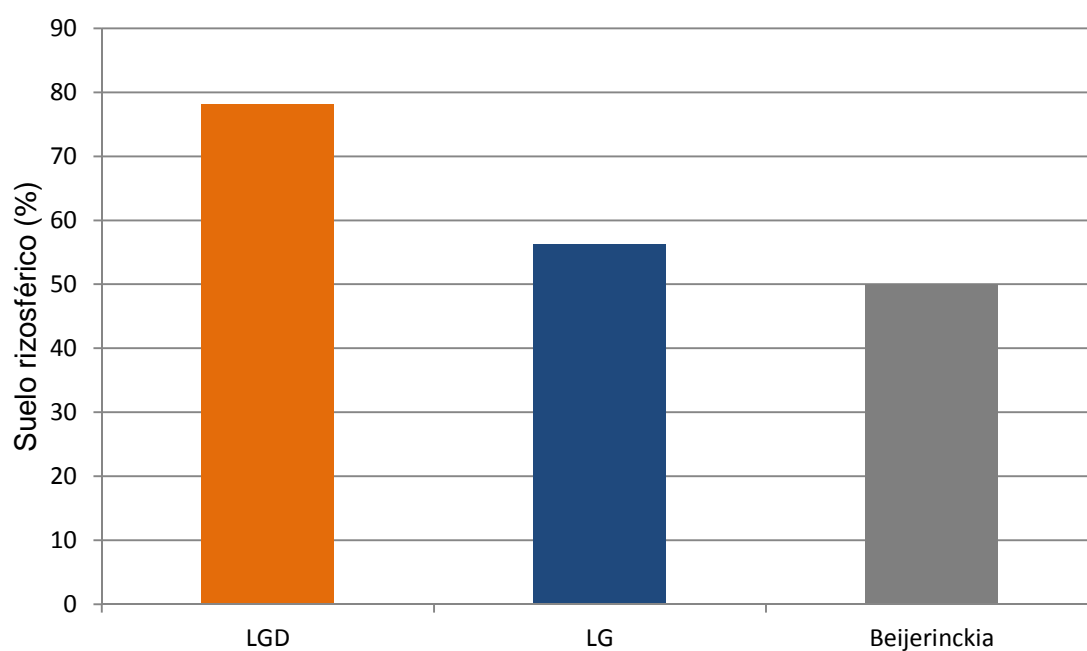


Figura 46. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios sólidos.



Figura 47. Cultivos puros de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias.

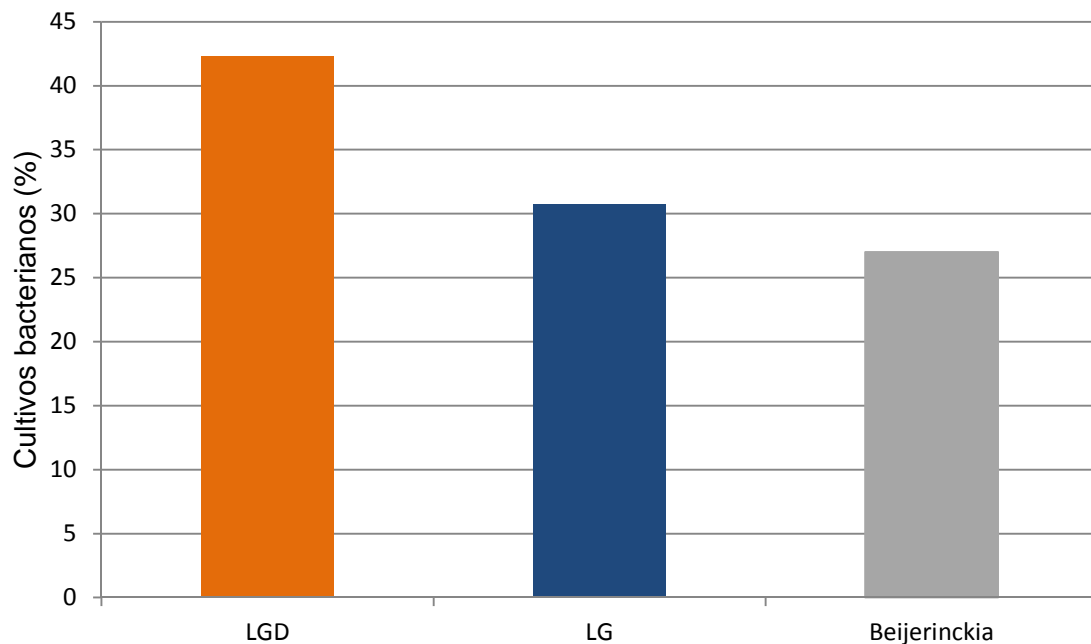


Figura 48. Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios sólidos.



Figura 49. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio NFb.



Figura 50. Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio JNFb.

En el medio NFb, con un color inicial celeste-verdoso, se observó viraje del indicador al celeste-azulado. La frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de espárrago positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 83,3% después de la siembra, así como 69,7; 58,3 y 47,9% después de tres subcultivos respectivamente (Figura 51).

En el medio LGI, con un color inicial verde, se observó viraje del indicador al amarillo. La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de espárrago positivas para bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 64,5% después de la siembra, así como 55,2; 44,7 y 41,6% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 52).

En el medio JNFb, con un color inicial amarillo, se observó viraje del indicador al celeste-azulado. La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de espárrago positivas para bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 78,1% después de la siembra, así como 61,4; 47,9 y 41,6% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 53).

En el medio JMV, con un color inicial amarillo opaco, no se observó viraje del indicador. La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de espárrago positivas para bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 80,2% después de la siembra, así como 61,4; 50 y 36,4% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 54).

La frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de espárrago con bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas después de tres subcultivos fue 47,9% (46) en NFb; 41,6% (40) en JNFb; 41,6% (40) en LGI y 36,4% (35) en JMV (Figura 55). En el aislamiento se obtuvieron 101 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya procedencia correspondió al 28,7% (29) en NFb, 24,8% (25) en JNFb, 24,8% (25) en LGI y 21,7% (22) en JMV (Figura 56).

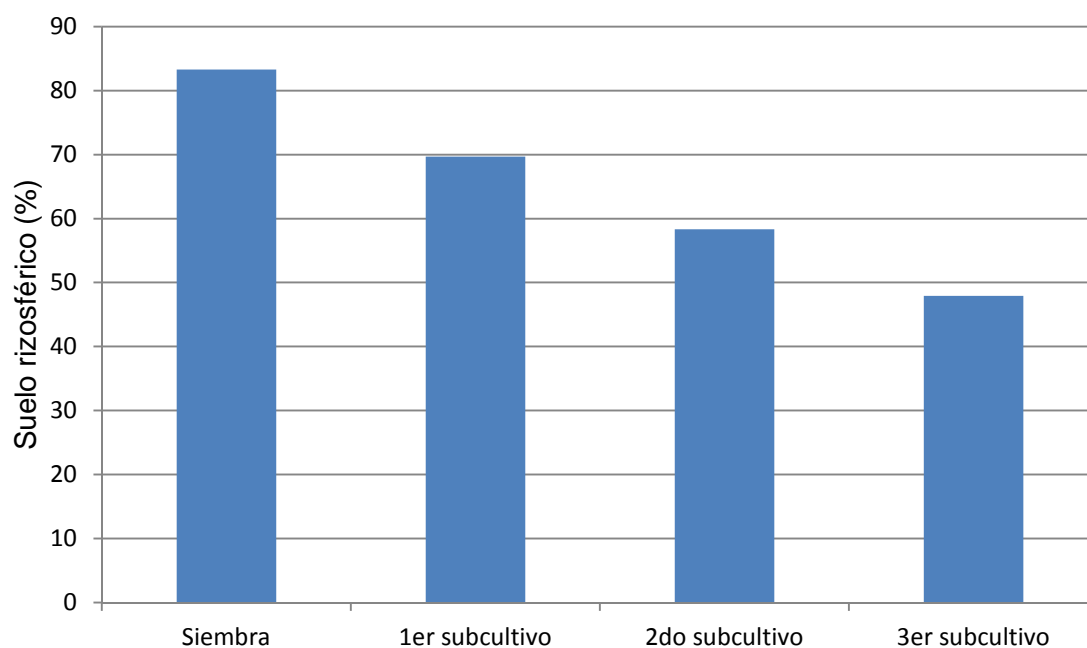


Figura 51. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en NFB después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

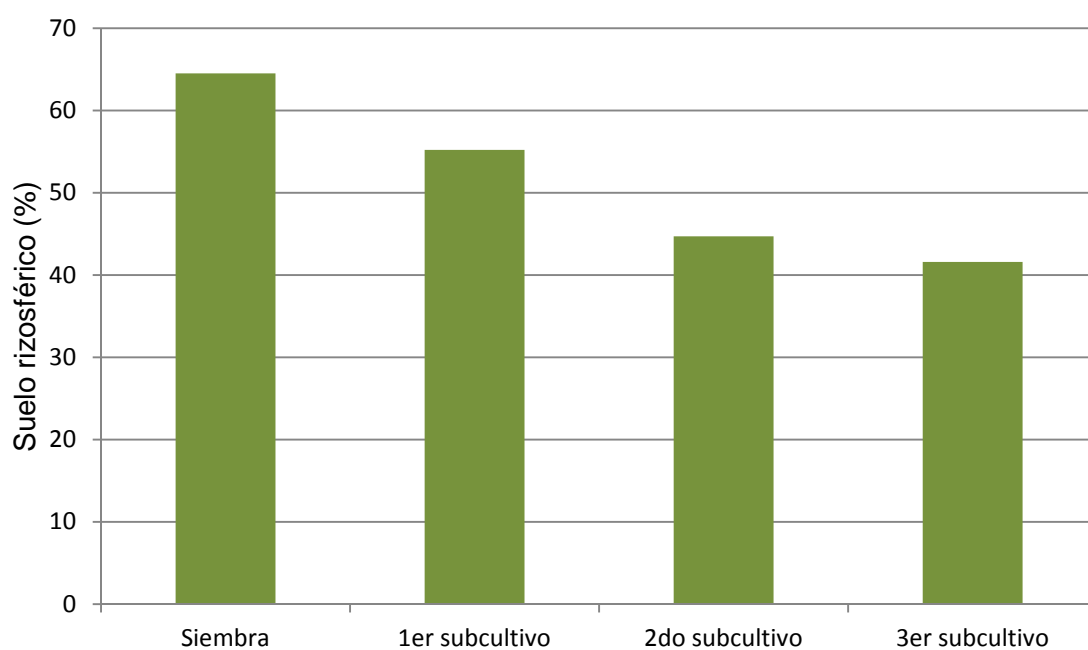


Figura 52. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

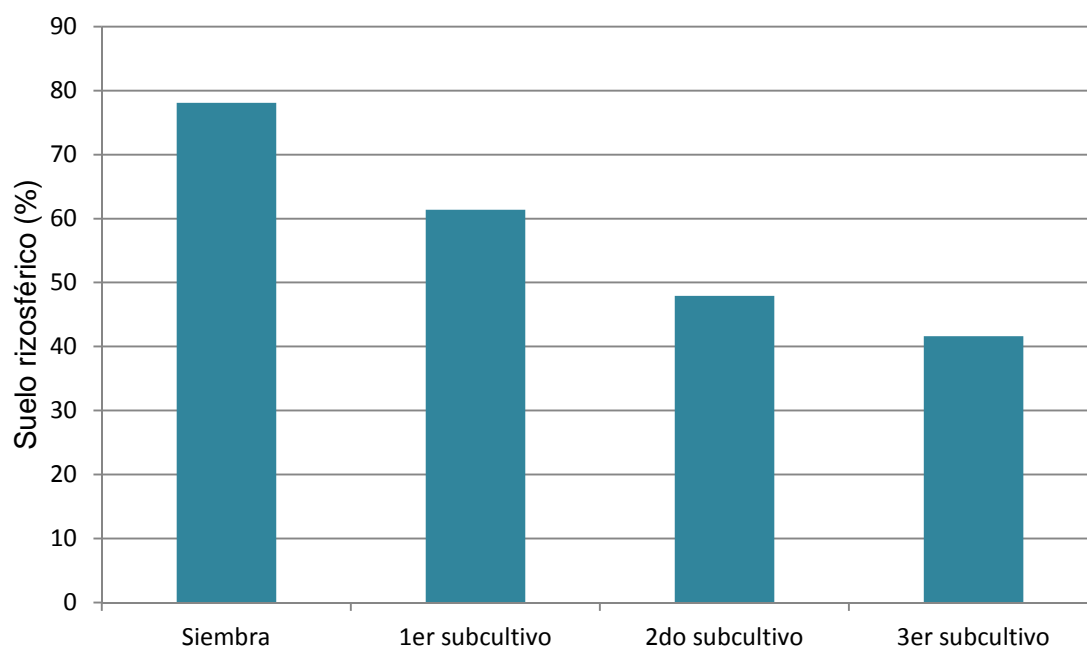


Figura 53. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

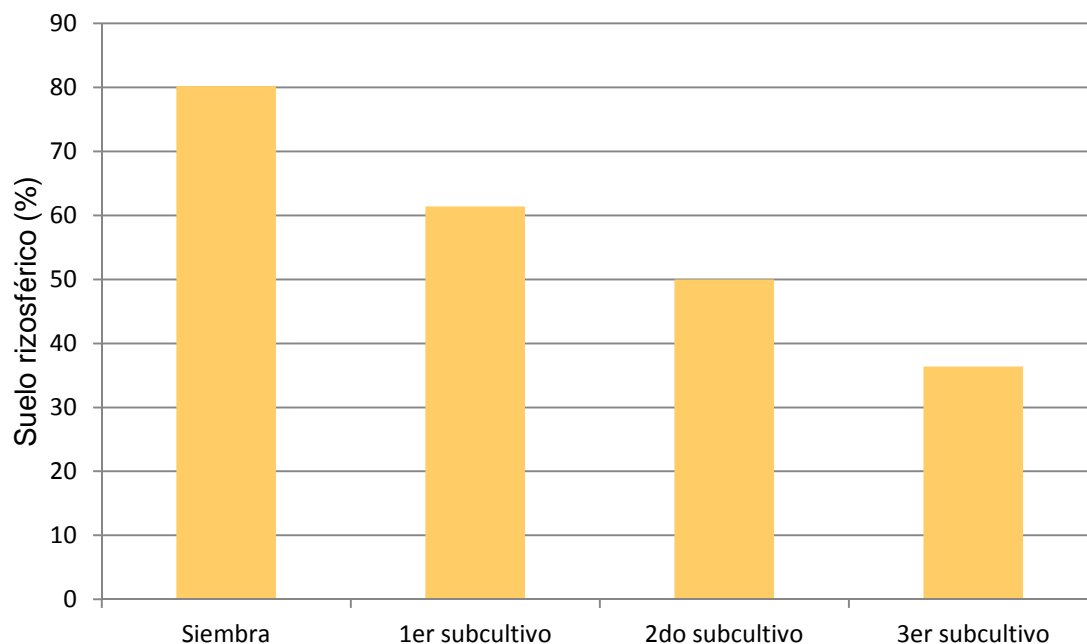


Figura 54. Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

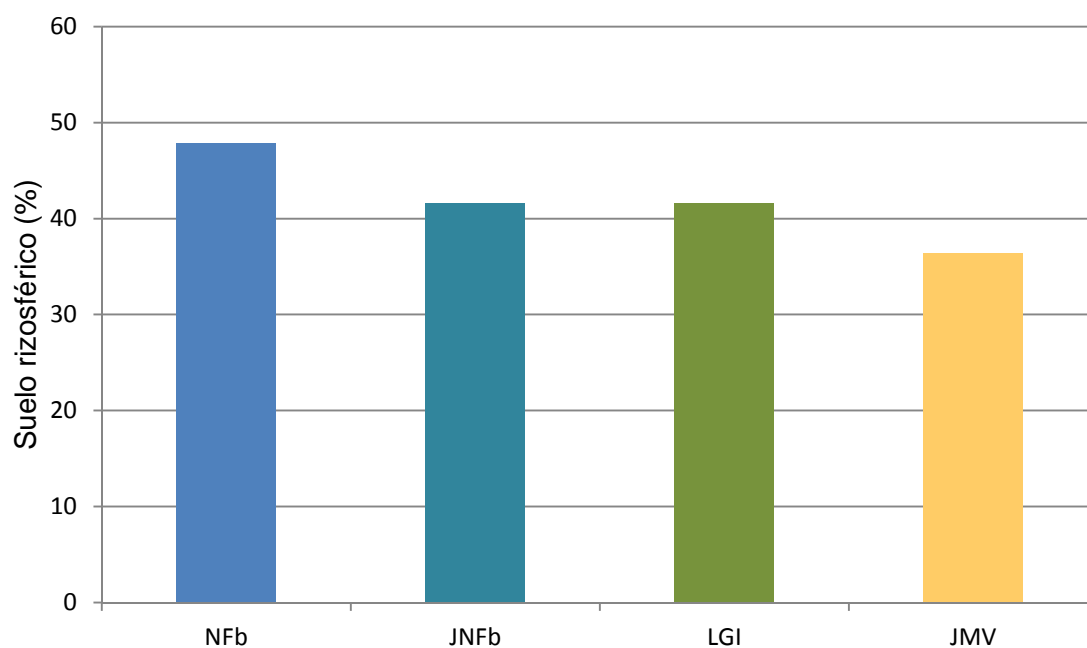


Figura 55. Frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. con bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas en cuatro medios semisólidos después de tres subcultivos.

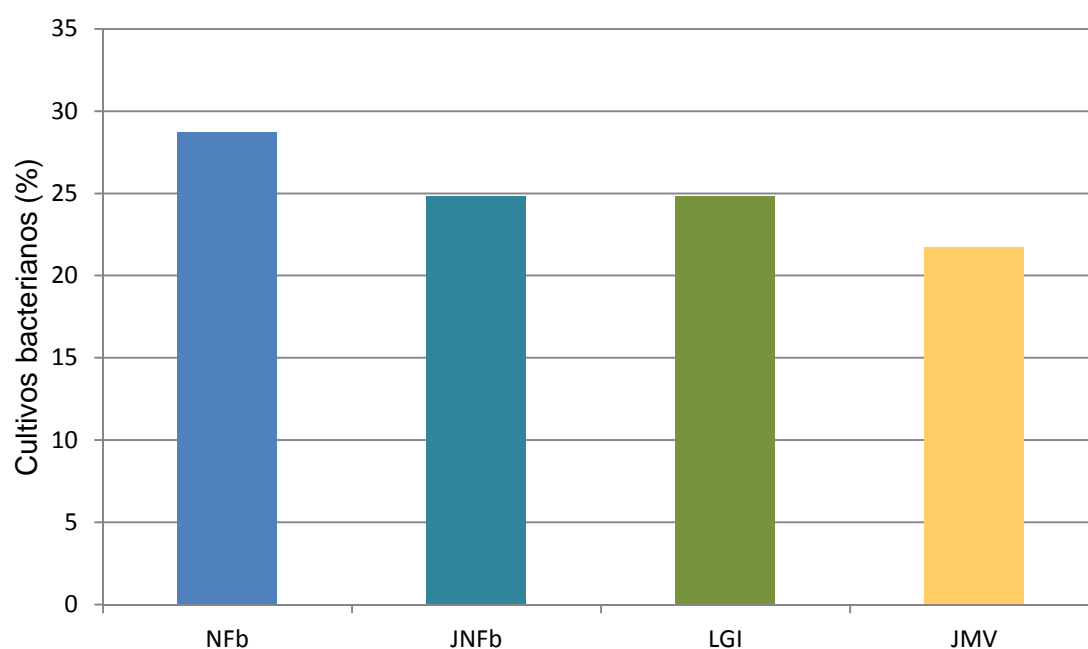


Figura 56. Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas de suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en cuatro medios semisólidos.

4.3 Géneros de bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno identificadas fenotípicamente

En las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces (80) de espárrago, se identificaron los géneros *Azospirillum* (41,2%), *Herbaspirillum* (21,2%), *Burkholderia* (18,8%) y *Gluconacetobacter* (18,8%). En las bacterias endófitas aisladas de tallos (110) se identificaron los géneros *Azospirillum* (59,1%), *Herbaspirillum* (20,9%) y *Burkholderia* (20%).

En las bacterias rizoféricas aerobias (111) aisladas de espárrago se identificaron los géneros *Derxia* (42,3%), *Azotobacter* (30,7%) y *Beijerinckia* (27%). En las bacterias rizosféricas microaerófilas (101) se identificaron los géneros *Azospirillum* (53,5%), *Herbaspirillum* (24,7%) y *Burkholderia* (21,8%).

En los 402 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces, tallos y suelo rizosférico de espárrago (Figura 57) se identificaron los géneros *Azospirillum* (37,8%), *Herbaspirillum* (16,2%), *Burkholderia* (14,6%), *Derxia* (11,7%), *Azotobacter* (8,5%), *Beijerinckia* (7,5%) y *Gluconacetobacter* (3,7%).

Las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* se observaron como bacilos Gram negativos, móviles, positivos en las pruebas de catalasa, oxidasa y utilización del ácido málico como fuente de carbono para la fijación de nitrógeno (Tabla 3). Las pruebas mencionadas, junto a la hidrólisis de la urea, reducción de nitratos y presencia de gránulos de polihidroxialcanoatos (PHA), identificaron al género *Azospirillum*.

Los géneros de las bacterias restantes se identificaron por la utilización de glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, así como por el crecimiento en caldo NFb, para *Herbaspirillum*; hidrólisis de urea, gelatina y reducción de nitratos para *Gluconacetobacter*; hidrólisis de la gelatina, descarboxilación de lisina y resistencia a 300UI de Polimixina B para *Burkholderia*.

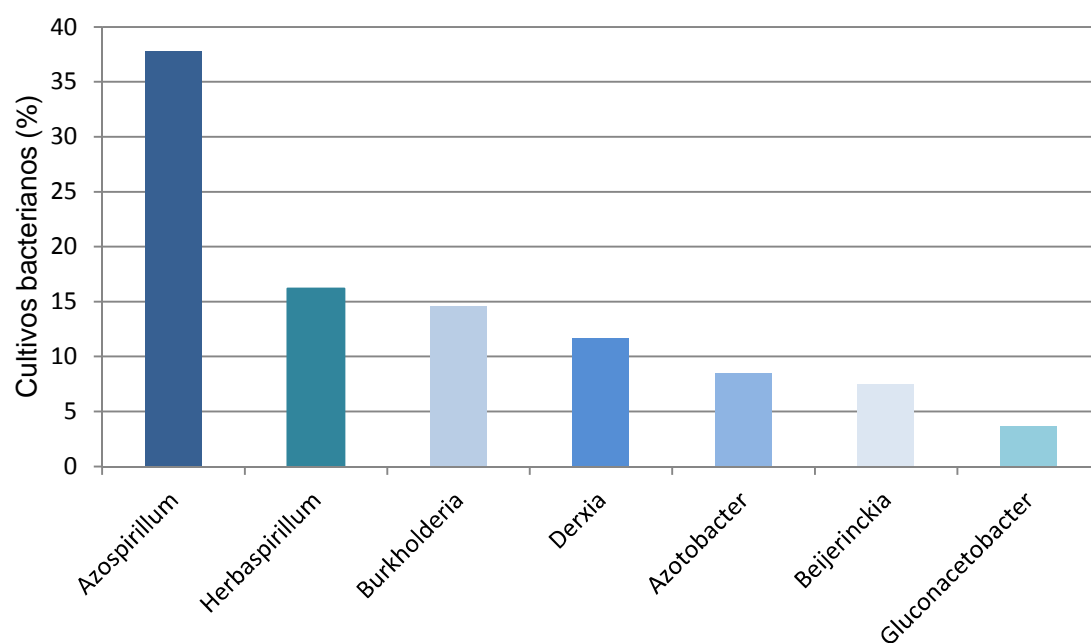


Figura 57. Frecuencia de géneros identificados en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Tabla 3. Características diferenciales de las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas

Características	<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>Gluconacetobacter</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.
Células	Pleomórficas	Bacilos curvos	Bacilos pequeños	Bacilos rectos
Tinción de Gram	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+
Catalasa	+	+/-	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
Hidrólisis de la úrea	+	+/-	+	
Hidrólisis de gelatina	-/+		+	+
Reducción de nitratos	+		+	
Hidrólisis de almidón			+	
Descarboxilación de lisina		+		+
Crecimiento en caldo NFb				
Fuente de C(fijación de N):				
▪ Ácido málico	+	+	+	+
▪ Glucosa	-/+	+	+	+
▪ Manitol	-/+	+	+	+
▪ Sacarosa	-/+	+	+	+
Gránulos de PHA	+		+	
Resistencia a la Polimixina B(300J)				+

* (+) positivo; (-) negativo.

Las bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Beijerinckia* se observaron como bacilos Gram negativos, positivos en catalasa y oxidasa (Tabla 4). Estas pruebas junto a la acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y reducción de nitratos diferenciaron al género *Azotobacter* sp. El género *Derxia* se identificó por la producción de indol, utilización de citrato como fuente de carbono y energía, crecimiento en 1% de peptona y acidificación de la glucosa, manitol y sacarosa. El género *Beijerinckia* se identificó por la acidificación de glucosa, manitol y sacarosa y no producción de indol, ni crecimiento en 1% de peptona.

4.4 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por bacterias endófitas y rizosféricas

El 100% (190) de cultivos de bacterias endófitas: 42,1% (80) de raíces y 57,9% (110) de tallos y 95,7% (203) de bacterias rizosféricas: 50,9% (108) aerobias y 44,8% (95) microaerófilas fijaron nitrógeno *in vitro* y como producto de la fijación se detectó amonio, evidenciado por una coloración azul (Figura 58). Los rangos en la concentración de amonio, alcanzados con las bacterias endófitas (Tablas 5,6) fueron de 1,49-37,52ppm (raíces), 1,13-35,50ppm (tallos) y con las bacterias rizosféricas (Tablas 7,8) fueron de 0,39-35,69ppm (aerobias) y 0,21-32,01ppm (microaerófilas).

El 100% (190) de cultivos de bacterias endófitas: 42,1% (80) de raíces y 57,9% (110) de tallos y 97,6% (207) de bacterias rizosféricas: 50,9% (108) aerobias y 46,7% (99) microaerófilas solubilizaron fosfato *in vitro* y como producto de la solubilización se detectó fósforo soluble, evidenciado por una coloración azul (Figura 59). Los rangos en la concentración de fósforo soluble, alcanzados con las bacterias endófitas (Tablas 9,10) fueron de 1,14-29,9ppm (raíces), 1,00-29,75ppm (tallos) y con las bacterias rizosféricas (Tablas 11,12) fueron de 0,85-34,53ppm (aerobias) y 0,71-30,48ppm (microaerófilas).

Tabla 4. Características diferenciales de bacterias rizofericas fijadoras de nitrógeno aerobias

Características	<i>Azotobacter</i> spp.	<i>Derxia</i> spp.	<i>Beijerinckia</i> spp.
Células	Bacilos rectos	Bacilos pequeños	Bacilos pequeños
Tinción de Gram	-	-	-
Motilidad	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Producción de indol		+	-
Utilización de citrato		+	+/-
Crecimiento en 1% peptona		+	-
Acidificación de :			
- Glucosa	+	+	+
- Sacarosa	+	+	+
- Fructosa	+		
- Maltosa	+		
- Manitol		+	+
Reducción de nitratos	+		

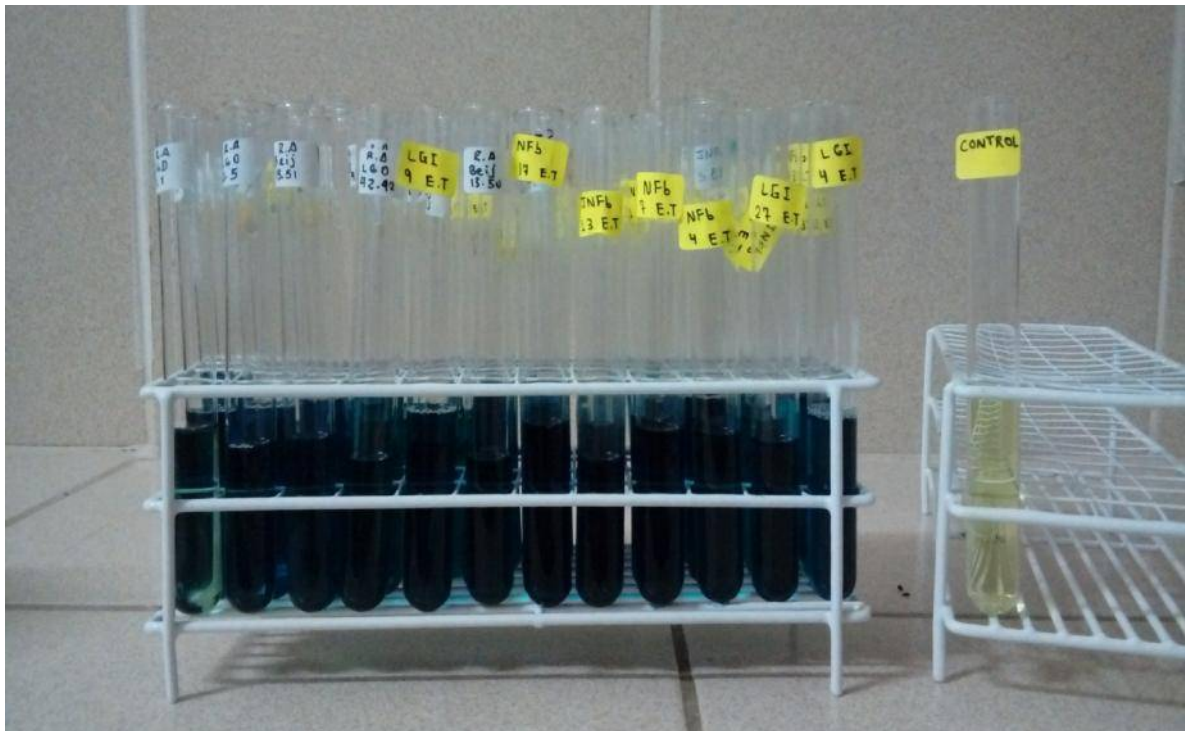


Figura 58. Coloración observada en la cuantificación de amonio.

Tabla 5. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias endófitas aisladas de raíces *Asparagus officinalis* L.

Bacterias endófitas	Amonio (ppm)	Bacterias endófitas	Amonio (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb19ER	37,52	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P53ER	20,24
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb5ER	32,93	<i>Azospirillum</i> sp. LGI61ER	20,24
<i>Burkholderia</i> sp. JMV25ER	32,74	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22bER	20,24
<i>Burkholderia</i> sp. JMV10ER	30,54	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2ER	20,24
<i>Azospirillum</i> sp. NFb33ER	28,70	<i>Azospirillum</i> sp. NFb14ER	20,06
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15ER	27,60	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P51ER	19,88
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb23ER	25,94	<i>Burkholderia</i> sp. JMV9ER	19,88
<i>Azospirillum</i> sp. LGI1ER	25,21	<i>Burkholderia</i> sp. JMV7ER	19,69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV15ER	25,21	<i>Azospirillum</i> sp. NFb35ER	19,69
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18ER	24,66	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P33ER	19,69
<i>Azospirillum</i> sp. LGI2ER	24,66	<i>Azospirillum</i> sp. LGI39ER	19,33
<i>Azospirillum</i> sp. NFb28ER	24,10	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7ER	18,96
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21ER	24,10	<i>Azospirillum</i> sp. NFb38ER	18,77
<i>Azospirillum</i> sp. NFb22ER	24,10	<i>Azospirillum</i> sp. NFb16ER	18,41
<i>Burkholderia</i> sp. JMV24ER	23,74	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20ER	18,41
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb25ER	23,74	<i>Azospirillum</i> sp. NFb26ER	18,04
<i>Burkholderia</i> sp. JMV2ER	23,74	<i>Burkholderia</i> sp. JMV12ER	17,85
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P47ER	23,19	<i>Azospirillum</i> sp. LGI28ER	17,85
<i>Azospirillum</i> sp. LGI64ER	23,19	<i>Azospirillum</i> sp. LGI15ER	17,67
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P52ER	22,63	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P6ER	16,94
<i>Azospirillum</i> sp. LGI13ER	22,45	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27ER	16,94
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P2ER	22,27	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P13ER	16,94
<i>Burkholderia</i> sp. JMV18ER	22,08	<i>Azospirillum</i> sp. LGI3ER	16,75
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb26ER	22,08	<i>Burkholderia</i> sp. JMV13ER	16,75
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb34ER	21,90	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P50ER	16,38
<i>Burkholderia</i> sp. JMV5ER	21,72	<i>Azospirillum</i> sp. LGI7ER	16,20
<i>Azospirillum</i> sp. NFb29ER	21,53	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P22ER	16,02
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb37ER	21,35	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17ER	15,83
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1ER	21,16	<i>Azospirillum</i> sp. NFb19ER	15,65
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17ER	20,98	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P8ER	15,47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb30ER	20,98	<i>Azospirillum</i> sp. LGI9ER	15,28
<i>Azospirillum</i> sp. NFb32ER	20,80	<i>Azospirillum</i> sp. NFb12ER	15,28
<i>Burkholderia</i> sp. JMV17ER	20,61	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P1ER	14,91

Continuación...

Bacterias endófitas	Amonio (ppm)	Bacterias endófitas	Amonio (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. NFb25ER	14,73	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb27ER	11,79
<i>Azospirillum</i> sp. NFb24ER	14,55	<i>Burkholderia</i> sp. JMV6ER	11,60
<i>Azospirillum</i> sp. LGI51ER	13,99	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21ER	11,42
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P48ER	13,81	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4ER	10,50
<i>Burkholderia</i> sp. JMV16ER	13,08	<i>Azospirillum</i> sp. LGI10ER	3,88
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P45ER	12,89	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22aER	3,88
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P49ER	12,52	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11ER	1,49

Tabla 6. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias endófitas aisladas de tallos de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias endófitas	Amonio (ppm)	Bacterias endófitas	Amonio (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15ET	35,50	<i>Azospirillum</i> sp. NFb20ET	22,82
<i>Azospirillum</i> sp. NFb14ET	35,13	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20ET	22,82
<i>Burkholderia</i> sp. JMV10ET	33,11	<i>Azospirillum</i> sp. LGI5ET	22,63
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1ET	32,93	<i>Azospirillum</i> sp. LGI15ET	22,63
<i>Azospirillum</i> sp. NFb40ET	31,83	<i>Azospirillum</i> sp. NFb15ET	22,45
<i>Azospirillum</i> sp. LGI23ET	29,25	<i>Azospirillum</i> sp. NFb1ET	22,27
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4ET	28,70	<i>Burkholderia</i> sp. JMV11ET	22,08
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22ET	28,15	<i>Azospirillum</i> sp. NFb38ET	21,90
<i>Azospirillum</i> sp. NFb13ET	27,05	<i>Burkholderia</i> sp. JMV13ET	21,72
<i>Azospirillum</i> sp. LGI6ET	26,86	<i>Burkholderia</i> sp. JMV 16ET	21,53
<i>Azospirillum</i> sp. NFb31ET	26,13	<i>Azospirillum</i> sp. LGI4ET	21,53
<i>Burkholderia</i> sp. JMV17ET	25,94	<i>Azospirillum</i> sp. NFb16ET	21,35
<i>Azospirillum</i> sp. LGI22ET	25,94	<i>Azospirillum</i> sp. LGI19ET	21,16
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb9ET	25,76	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb11ET	20,80
<i>Azospirillum</i> sp. NFb28ET	25,76	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb16ET	20,61
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb19ET	25,58	<i>Azospirillum</i> sp. NFb25ET	20,61
<i>Burkholderia</i> sp. JMV23ET	25,58	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb14ET	20,43
<i>Azospirillum</i> sp. LGI29ET	25,02	<i>Azospirillum</i> sp. LGI1ET	20,43
<i>Azospirillum</i> sp. NFb8ET	25,02	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb21ET	20,43
<i>Azospirillum</i> sp. LGI17ET	24,66	<i>Azospirillum</i> sp. LGI33ET	20,43
<i>Azospirillum</i> sp. NFb12ET	24,66	<i>Burkholderia</i> sp. JMV9ET	20,06
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21ET	24,66	<i>Azospirillum</i> sp. LGI26ET	20,06
<i>Azospirillum</i> sp. NFb36ET	24,47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21ET	20,06
<i>Azospirillum</i> sp. LGI7ET	24,10	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb5ET	20,06
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb6ET	24,10	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb13ET	19,88
<i>Azospirillum</i> sp. LGI14ET	24,10	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2ET	19,51
<i>Azospirillum</i> sp. NFb22ET	23,74	<i>Azospirillum</i> sp. NFb33ET	19,51
<i>Azospirillum</i> sp. LGI16ET	23,74	<i>Azospirillum</i> sp. LGI3ET	19,51
<i>Burkholderia</i> sp. JMV19ET	23,74	<i>Azospirillum</i> sp. LGI9ET	19,51
<i>Azospirillum</i> sp. NFb10ET	23,55	<i>Azospirillum</i> sp. LGI27ET	19,33
<i>Azospirillum</i> sp. NFb35ET	23,37	<i>Azospirillum</i> sp. NFb42ET	19,33
<i>Azospirillum</i> sp. NFb4ET	23,00	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb3ET	19,33
<i>Azospirillum</i> sp. NFb29ET	23,00	<i>Burkholderia</i> sp. JMV5ET	19,14
<i>Burkholderia</i> sp. JMV2ET	22,82	<i>Burkholderia</i> sp. JMV22ET	18,96

Continuación...

Bacterias endófitas	Amonio (ppm)	Bacterias endófitas	Amonio (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. NFb43ET	18,59	<i>Azospirillum</i> sp. NFb18ET	15,83
<i>Azospirillum</i> sp. LGI13ET	18,59	<i>Burkholderia</i> sp. JMV4ET	15,83
<i>Burkholderia</i> sp. JMV15ET	18,59	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11ET	15,47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV30ET	18,41	<i>Burkholderia</i> sp. JMV32ET	14,73
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7ET	18,22	<i>Azospirillum</i> sp. LGI20ET	14,73
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1ET	18,22	<i>Azospirillum</i> sp. NFb39ET	14,73
<i>Azospirillum</i> sp. LGI8ET	18,04	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb10ET	14,18
<i>Azospirillum</i> sp. NFb2ET	18,04	<i>Azospirillum</i> sp. NFb26ET	13,81
<i>Azospirillum</i> sp. NFb3ET	17,85	<i>Azospirillum</i> sp. LGI18ET	13,63
<i>Azospirillum</i> sp. NFb27ET	17,67	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17ET	13,44
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12ET	17,49	<i>Burkholderia</i> sp. JMV8ET	13,26
<i>Azospirillum</i> sp. LGI10ET	17,49	<i>Azospirillum</i> sp. LGI24ET	13,26
<i>Burkholderia</i> sp. JMV7ET	17,30	<i>Azospirillum</i> sp. NFb32ET	13,26
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb23ET	17,30	<i>Azospirillum</i> sp. NFb37ET	13,08
<i>Azospirillum</i> sp. NFb34ET	17,30	<i>Azospirillum</i> sp. NFb23ET	10,69
<i>Azospirillum</i> sp. LGI21ET	17,30	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb24ET	10,32
<i>Burkholderia</i> sp. JMV14ET	17,12	<i>Burkholderia</i> sp. JMV18ET	10,32
<i>Burkholderia</i> sp. JMV6ET	16,57	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb8ET	6,46
<i>Azospirillum</i> sp. NFb5ET	16,38	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17ET	4,80
<i>Azospirillum</i> sp. LGI2ET	16,38	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb18ET	3,52
<i>Azospirillum</i> sp. NFb24ET	15,83	<i>Azospirillum</i> sp. NFb30ET	1,13

Tabla 7. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas aerobias aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias rizosféricas aerobias	Amonio (ppm)	Bacterias rizosféricas aerobias	Amonio (ppm)
<i>Azotobacter</i> sp. LG16.28AR	35,69	<i>Derxia</i> sp. LGD35.33	20,61
<i>Beijerinckia</i> sp. 5.33R	34,03	<i>Azotobacter</i> sp. LG66.14AR	20,43
<i>Beijerinckia</i> sp. 13.54R	27,05	<i>Azotobacter</i> sp. LG65.14AR	20,24
<i>Azotobacter</i> sp. LG9.56AR	26,13	<i>Derxia</i> sp. LGD11.11	19,51
<i>Beijerinckia</i> sp. 23.45R	25,76	<i>Beijerinckia</i> sp. 10.27R	19,33
<i>Azotobacter</i> sp. LG63.13AR	25,39	<i>Azotobacter</i> sp. LG44.40AR	19,14
<i>Derxia</i> sp. LGD17.18	24,66	<i>Beijerinckia</i> sp. 49.1R	19,14
<i>Derxia</i> sp. LGD40.13	24,66	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.51R	18,59
<i>Derxia</i> sp. LGD38.19	24,29	<i>Beijerinckia</i> sp. 27.41R	18,59
<i>Derxia</i> sp. LGD42.42	24,29	<i>Derxia</i> sp. LGD38.36	18,59
<i>Beijerinckia</i> sp. 10.35R	24,10	<i>Beijerinckia</i> sp. 23.47R	18,41
<i>Azotobacter</i> sp. LG80.18AR	23,74	<i>Derxia</i> sp. LGD28.25	18,41
<i>Azotobacter</i> sp. LG13.25AR	23,55	<i>Derxia</i> sp. LGD37.10	18,41
<i>Derxia</i> sp. LGD3.26	23,55	<i>Beijerinckia</i> sp. 15.41R	18,22
<i>Beijerinckia</i> sp. 2.4R	23,37	<i>Derxia</i> sp. LGD24.52	18,22
<i>Derxia</i> sp. LGD23.44	23,37	<i>Beijerinckia</i> sp. 17.35R	17,85
<i>Derxia</i> sp. LGD2.40	23,19	<i>Derxia</i> sp. LGD17.17	17,85
<i>Azotobacter</i> sp. LG17.36AR	22,82	<i>Azotobacter</i> sp. LG28.18AR	17,49
<i>Derxia</i> sp. LGD24.53	22,82	<i>Azotobacter</i> sp. LG45.51AR	17,49
<i>Derxia</i> sp. LGD35.4	22,82	<i>Azotobacter</i> sp. LG7.8AR	17,49
<i>Beijerinckia</i> sp. 18.9R	22,63	<i>Beijerinckia</i> sp. 21.58R	17,49
<i>Azotobacter</i> sp. LG32.65AR	22,45	<i>Beijerinckia</i> sp. 45.22R	17,30
<i>Beijerinckia</i> sp. 39.23R	22,45	<i>Derxia</i> sp. LGD42.49	17,30
<i>Beijerinckia</i> sp. 1.1R	21,90	<i>Azotobacter</i> sp. LG35.45AR	17,12
<i>Derxia</i> sp. LGD39.2	21,90	<i>Derxia</i> sp. LGD5.58	17,12
<i>Azotobacter</i> sp. LG12.17AR	21,53	<i>Beijerinckia</i> sp. 27.43R	16,94
<i>Azotobacter</i> sp. LG18.9AR	21,53	<i>Beijerinckia</i> sp. 5.32R	16,94
<i>Azotobacter</i> sp. LG15.47AR	21,35	<i>Derxia</i> sp. LGD25.25	16,94
<i>Azotobacter</i> sp. LG38.72AR	21,35	<i>Azotobacter</i> sp. LG72.15AR	16,75
<i>Derxia</i> sp. LGD44.55	21,35	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.50R	16,75
<i>Azotobacter</i> sp. LG2.4AR	20,98	<i>Derxia</i> sp. LGD11.14	16,75
<i>Derxia</i> sp. LGD37.35	20,80	<i>Derxia</i> sp. LGD29.27	16,75
<i>Azotobacter</i> sp. LG84.19AR	20,61	<i>Azotobacter</i> sp. LG44.10AR	16,38

Continuación...

Bacterias rizosféricas aerobias	Amonio (ppm)	Bacterias rizosféricas aerobias	Amonio (ppm)
<i>Derxia</i> sp. LGD42.47	16,20	<i>Derxia</i> sp. LGD20.56	11,97
<i>Azotobacter</i> sp. LG95.22AR	16,02	<i>Derxia</i> sp. LGD46.48	11,97
<i>Azotobacter</i> sp. LG28.19AR	15,83	<i>Derxia</i> sp. LGD43.37	11,60
<i>Beijerinckia</i> sp. 14.56R	15,65	<i>Derxia</i> sp. LGD34.32	11,42
<i>Azotobacter</i> sp. LG63.13AR	15,28	<i>Beijerinckia</i> sp. 30.2R	11,24
<i>Derxia</i> sp. LGD4.51	15,28	<i>Beijerinckia</i> sp. 49.7R	10,87
<i>Azotobacter</i> sp. LG24.46AR	14,91	<i>Derxia</i> sp. LGD14.63	10,69
<i>Derxia</i> sp. LGD42.48	14,91	<i>Azotobacter</i> sp. LG30.68AR	10,32
<i>Azotobacter</i> sp. LG35.44AR	14,73	<i>Derxia</i> sp. LGD3.5	9,77
<i>Beijerinckia</i> sp. 14.53R	14,18	<i>Azotobacter</i> sp. LG83.19AR	9,22
<i>Derxia</i> sp. LGD37.11	13,99	<i>Beijerinckia</i> sp. 16.38R	9,22
<i>Azotobacter</i> sp. LG95.21AR	13,81	<i>Derxia</i> sp. LGD36.34	9,22
<i>Beijerinckia</i> sp. 35.4R	13,63	<i>Azotobacter</i> sp. LG 80.17AR	9,03
<i>Derxia</i> sp. LGD21.54	13,63	<i>Derxia</i> sp. LGD33.36	9,03
<i>Azotobacter</i> sp. LG30.67AR	13,44	<i>Derxia</i> sp. LGD32.31	8,11
<i>Derxia</i> sp. LGD3.25	13,26	<i>Azotobacter</i> sp. LG82.18AR	3,52
<i>Derxia</i> sp. LGD14.16	13,08	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.52R	2,23
<i>Derxia</i> sp. LGD25.23	13,08	<i>Derxia</i> sp. LGD32.30	2,05
<i>Derxia</i> sp. LGD5.57	13,08	<i>Derxia</i> sp. LGD44.45	2,05
<i>Beijerinckia</i> sp. 10.34R	12,89	<i>Beijerinckia</i> sp. 17.36R	0,94
<i>Derxia</i> sp. LGD34.33	12,89	<i>Derxia</i> sp. LGD45.47	0,94
<i>Azotobacter</i> sp. LG1.1AR	12,16	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.25R	0,39
<i>Derxia</i> sp. LGD38.20	12,16		

Tabla 8. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas microaerófilas aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias rizosféricas microaerófilas	Amonio (ppm)	Bacterias rizosféricas microaerófilas	Amonio (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. LGI11RM	32,01	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb34RM	16,75
<i>Azospirillum</i> sp. NFb23RM	26,68	<i>Azospirillum</i> sp. NFb13RM	16,38
<i>Azospirillum</i> sp. NFb5RM	25,39	<i>Azospirillum</i> sp. LGI5RM	16,02
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb12RM	25,21	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2RM	16,02
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17RM	24,66	<i>Azospirillum</i> sp. NFb10RM	15,83
<i>Burkholderia</i> sp. JMV12RM	24,10	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7RM	15,83
<i>Azospirillum</i> sp. LGI16RM	23,92	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb8RM	15,83
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb36RM	23,92	<i>Azospirillum</i> sp. NFb28RM	15,65
<i>Azospirillum</i> sp. LGI31RM	23,55	<i>Burkholderia</i> sp. JMV14RM	15,65
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb18RM	23,19	<i>Azospirillum</i> sp. LGI27RM	15,47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV27RM	22,82	<i>Burkholderia</i> sp. JMV15RM	15,47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV16RM	22,63	<i>Burkholderia</i> sp. JMV17RM	15,47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV13RM	22,27	<i>Azospirillum</i> sp. LGI19RM	15,28
<i>Azospirillum</i> sp. NFb12RM	21,90	<i>Azospirillum</i> sp. LGI38RM	15,28
<i>Burkholderia</i> sp. JMV6RM	21,90	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb28RM	15,28
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15RM	21,90	<i>Azospirillum</i> sp. LGI2RM	15,10
<i>Azospirillum</i> sp. LGI22RM	21,72	<i>Azospirillum</i> sp. LGI28RM	14,91
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1RM	21,53	<i>Azospirillum</i> sp. NFb19RM	14,91
<i>Azospirillum</i> sp. NFb24RM	20,80	<i>Azospirillum</i> sp. NFb30RM	14,91
<i>Burkholderia</i> sp. JMV33RM	20,61	<i>Burkholderia</i> sp. JMV3RM	14,91
<i>Azospirillum</i> sp. NFb14RM	20,43	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb9RM	14,91
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	20,24	<i>Azospirillum</i> sp. NFb1RM	14,73
<i>Azospirillum</i> sp. NFb6RM	19,51	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27RM	14,55
<i>Burkholderia</i> sp. JMV21RM	19,33	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb30RM	14,36
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb14RM	19,33	<i>Azospirillum</i> sp. LGI13RM	14,18
<i>Azospirillum</i> sp. NFb15RM	19,14	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb32RM	13,99
<i>Azospirillum</i> sp. LGI15RM	18,41	<i>Azospirillum</i> sp. LGI10RM	13,81
<i>Azospirillum</i> sp. NFb3RM	18,22	<i>Azospirillum</i> sp. LGI18RM	13,81
<i>Azospirillum</i> sp. NFb8RM	17,85	<i>Burkholderia</i> sp. JMV7RM	13,81
<i>Azospirillum</i> sp. NFb20RM	17,67	<i>Azospirillum</i> sp. NFb7RM	13,26
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18RM	17,49	<i>Burkholderia</i> sp. JMV20RM	13,26
<i>Azospirillum</i> sp. NFb29RM	17,30	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4RM	13,26
<i>Azospirillum</i> sp. LGI17RM	17,12	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb27RM	13,08
<i>Burkholderia</i> sp. JMV25RM	17,12	<i>Burkholderia</i> sp. JMV11RM	12,89

Continuación...

Bacterias rizosféricas microaerófilas	Amonio (ppm)	Bacterias rizosféricas microaerófilas	Amonio (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. LGI6RM	12,71	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb31RM	2,97
<i>Azospirillum</i> sp. NFb9RM	12,71	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17RM	2,41
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb24RM	12,52	<i>Azospirillum</i> sp. NFb21RM	2,23
<i>Azospirillum</i> sp. LGI29RM	11,97	<i>Azospirillum</i> sp. LGI4RM	2,05
<i>Burkholderia</i> sp. JMV10RM	11,97	<i>Azospirillum</i> sp. LGI8RM	2,05
<i>Burkholderia</i> sp. JMV18RM	11,97	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11RM	2,05
<i>Azospirillum</i> sp. LGI32RM	11,60	<i>Azospirillum</i> sp. LGI21RM	1,86
<i>Azospirillum</i> sp. NFb4RM	11,05	<i>Burkholderia</i> sp. JMV22RM	1,49
<i>Azospirillum</i> sp. LGI7RM	10,69	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb33RM	1,49
<i>Azospirillum</i> sp. LGI9RM	9,77	<i>Azospirillum</i> sp. LGI30RM	1,13
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb29RM	9,40	<i>Azospirillum</i> sp. NFb26RM	0,76
<i>Azospirillum</i> sp. NFb25RM	8,66	<i>Azospirillum</i> sp. NFb31RM	0,76
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1RM	8,11	<i>Burkholderia</i> sp. JMV2RM	0,58
<i>Azospirillum</i> sp. NFb33RM	6,09	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb26RM	0,58
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb11RM	4,44	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb6RM	0,58
<i>Azospirillum</i> sp. LGI1RM	4,25	<i>Burkholderia</i> sp. JMV24RM	0,21
<i>Burkholderia</i> sp. JMV19RM	4,25		



Figura 59. Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.

Tabla 9. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias endófitas aisladas de raíces de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22bER	29,90	<i>Azospirillum</i> sp. LGI7ER	12,85
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P45ER	29,32	<i>Azospirillum</i> sp. NFb24ER	12,85
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22aER	29,32	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20ER	12,70
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P52ER	28,60	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21ER	12,41
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb27ER	28,31	<i>Azospirillum</i> sp. NFb32ER	12,27
<i>Azospirillum</i> sp. NFb30ER	27,88	<i>Burkholderia</i> sp. JMV16ER	12,27
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15ER	27,88	<i>Azospirillum</i> sp. NFb26ER	12,12
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P1ER	27,30	<i>Azospirillum</i> sp. LGI15ER	11,98
<i>Azospirillum</i> sp. NFb11ER	27,30	<i>Azospirillum</i> sp. NFb12ER	11,69
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21ER	27,30	<i>Burkholderia</i> sp. JMV6ER	11,55
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P50ER	26,72	<i>Azospirillum</i> sp. NFb19ER	11,26
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb34ER	26,58	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27ER	10,97
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P53ER	26,43	<i>Azospirillum</i> sp. LGI1ER	10,82
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb23ER	24,84	<i>Azospirillum</i> sp. LGI64ER	10,82
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P51ER	21,95	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17ER	10,39
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P49ER	18,19	<i>Azospirillum</i> sp. NFb25ER	10,25
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P48ER	18,05	<i>Burkholderia</i> sp. JMV18ER	10,25
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P22ER	17,04	<i>Burkholderia</i> sp. JMV10ER	10,10
<i>Azospirillum</i> sp. LGI39ER	16,75	<i>Burkholderia</i> sp. JMV13ER	9,96
<i>Azospirillum</i> sp. LGI51ER	16,60	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1ER	8,37
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P2ER	16,46	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P8ER	7,79
<i>Burkholderia</i> sp. JMV25ER	16,03	<i>Burkholderia</i> sp. JMV24ER	7,79
<i>Azospirillum</i> sp. NFb22ER	15,74	<i>Burkholderia</i> sp. JMV9ER	7,21
<i>Burkholderia</i> sp. JMV2ER	15,59	<i>Burkholderia</i> sp. JMV12ER	6,49
<i>Azospirillum</i> sp. LGI3ER	15,45	<i>Azospirillum</i> sp. NFb29ER	6,05
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18ER	15,16	<i>Azospirillum</i> sp. LGI10ER	5,62
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb5ER	14,73	<i>Azospirillum</i> sp. LGI61ER	5,62
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4ER	14,00	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2ER	5,48
<i>Burkholderia</i> sp. JMV17ER	13,86	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7ER	5,19
<i>Azospirillum</i> sp. NFb28ER	13,57	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P47ER	4,75
<i>Burkholderia</i> sp. JMV15ER	13,42	<i>Azospirillum</i> sp. LGI28ER	4,75
<i>Azospirillum</i> sp. NFb14ER	13,28	<i>Burkholderia</i> sp. JMV7ER	4,75
<i>Burkholderia</i> sp. JMV5ER	13,14	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17ER	3,31

Continuación...

Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb37ER	2,59	<i>Azospirillum</i> sp. NFb16ER	1,43
<i>Azospirillum</i> sp. LGI9ER	2,44	<i>Azospirillum</i> sp. NFb35ER	1,43
<i>Azospirillum</i> sp. LGI2ER	2,15	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb25ER	1,43
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P33ER	1,86	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P13ER	1,29
<i>Azospirillum</i> sp. NFb38ER	1,72	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb19ER	1,29
<i>Azospirillum</i> sp. LGI13ER	1,58	<i>Azospirillum</i> sp. NFb33ER	1,14
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P6ER	1,43	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb26ER	1,14

Tabla 10. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias endófitas aisladas de tallos de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. NFb3ET	29,75	<i>Azospirillum</i> sp. NFb32ET	18,34
<i>Azospirillum</i> sp. LGI21ET	29,47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV15ET	17,90
<i>Azospirillum</i> sp. NFb11ET	28,89	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20ET	17,62
<i>Azospirillum</i> sp. NFb1ET	28,74	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2ET	16,60
<i>Azospirillum</i> sp. NFb33ET	28,31	<i>Burkholderia</i> sp. JMV13ET	16,46
<i>Azospirillum</i> sp. LGI27ET	28,02	<i>Azospirillum</i> sp. LGI18ET	16,03
<i>Burkholderia</i> sp. JMV2ET	27,88	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7ET	16,03
<i>Azospirillum</i> sp. NFb24ET	27,59	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1ET	15,88
<i>Azospirillum</i> sp. NFb8ET	27,59	<i>Azospirillum</i> sp. LGI22ET	15,74
<i>Azospirillum</i> sp. LGI2ET	27,30	<i>Azospirillum</i> sp. LGI9ET	15,30
<i>Azospirillum</i> sp. NFb13ET	27,30	<i>Burkholderia</i> sp. JMV9ET	15,01
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb9ET	27,15	<i>Azospirillum</i> sp. LGI7ET	14,15
<i>Azospirillum</i> sp. NFb31ET	27,01	<i>Burkholderia</i> sp. JMV14ET	14,15
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1ET	26,72	<i>Azospirillum</i> sp. NFb4ET	14,00
<i>Azospirillum</i> sp. LGI29ET	26,43	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb6ET	12,99
<i>Azospirillum</i> sp. LGI10ET	25,42	<i>Azospirillum</i> sp. LGI26ET	12,41
<i>Azospirillum</i> sp. NFb20ET	25,42	<i>Azospirillum</i> sp. LGI6ET	12,41
<i>Azospirillum</i> sp. NFb30ET	24,70	<i>Azospirillum</i> sp. LGI1ET	11,84
<i>Azospirillum</i> sp. NFb5ET	24,70	<i>Burkholderia</i> sp. JMV5ET	11,26
<i>Azospirillum</i> sp. NFb14ET	24,12	<i>Azospirillum</i> sp. LGI33ET	11,11
<i>Azospirillum</i> sp. NFb2ET	23,97	<i>Azospirillum</i> sp. NFb22ET	10,68
<i>Burkholderia</i> sp. JMV32ET	22,67	<i>Azospirillum</i> sp. NFb28ET	10,53
<i>Azospirillum</i> sp. LGI20ET	22,53	<i>Azospirillum</i> sp. NFb29ET	10,39
<i>Burkholderia</i> sp. JMV 16ET	21,81	<i>Azospirillum</i> sp. LGI13ET	10,25
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12ET	21,66	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb10ET	9,96
<i>Azospirillum</i> sp. LGI5ET	21,08	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15ET	9,81
<i>Burkholderia</i> sp. JMV30ET	21,08	<i>Azospirillum</i> sp. LGI14ET	9,09
<i>Burkholderia</i> sp. JMV11ET	20,94	<i>Burkholderia</i> sp. JMV19ET	9,09
<i>Azospirillum</i> sp. NFb12ET	19,64	<i>Burkholderia</i> sp. JMV6ET	8,66
<i>Azospirillum</i> sp. LGI16ET	19,35	<i>Burkholderia</i> sp. JMV18ET	8,22
<i>Azospirillum</i> sp. NFb10ET	19,35	<i>Burkholderia</i> sp. JMV10ET	8,08
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb18ET	19,35	<i>Burkholderia</i> sp. JMV22ET	7,50
<i>Burkholderia</i> sp. JMV23ET	19,06	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb11ET	7,21
<i>Azospirillum</i> sp. LGI23ET	18,63	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb3ET	6,92

Continuación...

Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias endófitas	Fósforo soluble (ppm)
<i>Burkholderia</i> sp. JMV8ET	6,49	<i>Azospirillum</i> sp. NFb36ET	1,86
<i>Azospirillum</i> sp. LGI24ET	6,34	<i>Azospirillum</i> sp. LGI3ET	1,72
<i>Azospirillum</i> sp. LGI8ET	5,33	<i>Azospirillum</i> sp. NFb42ET	1,72
<i>Azospirillum</i> sp. NFb16ET	4,61	<i>Azospirillum</i> sp. NFb25ET	1,58
<i>Burkholderia</i> sp. JMV7ET	4,61	<i>Azospirillum</i> sp. NFb38ET	1,58
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18ET	4,32	<i>Azospirillum</i> sp. NFb40ET	1,58
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21ET	4,18	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17ET	1,58
<i>Burkholderia</i> sp. JMV4ET	3,74	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27ET	1,43
<i>Burkholderia</i> sp. JMV17ET	3,45	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb16ET	1,43
<i>Azospirillum</i> sp. LGI17ET	3,16	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4ET	1,43
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb14ET	3,16	<i>Azospirillum</i> sp. NFb15ET	1,29
<i>Azospirillum</i> sp. LGI19ET	3,02	<i>Azospirillum</i> sp. NFb23ET	1,29
<i>Azospirillum</i> sp. LGI15ET	2,88	<i>Azospirillum</i> sp. NFb43ET	1,29
<i>Azospirillum</i> sp. LGI4ET	2,88	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22ET	1,29
<i>Azospirillum</i> sp. NFb34ET	2,88	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb23ET	1,29
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb5ET	2,88	<i>Azospirillum</i> sp. NFb39ET	1,14
<i>Azospirillum</i> sp. NFb17ET	2,44	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb19ET	1,14
<i>Azospirillum</i> sp. NFb26ET	2,44	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb21ET	1,14
<i>Burkholderia</i> sp. JMV21ET	2,30	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb24ET	1,14
<i>Azospirillum</i> sp. NFb35ET	2,01	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb8ET	1,14
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb13ET	2,01	<i>Azospirillum</i> sp. NFb37ET	1,00

Tabla 11. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias rizosféricas aerobias aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias rizosféricas aerobias	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias rizosféricas aerobias	Fósforo soluble (ppm)
<i>Azotobacter</i> sp. LG16.28AR	34,53	<i>Derxia</i> sp. LGD44.55	25,56
<i>Azotobacter</i> sp. LG12.17AR	33,55	<i>Derxia</i> sp. LGD35.4	24,70
<i>Azotobacter</i> sp. LG95.21AR	32,60	<i>Beijerinckia</i> sp. 10.27R	23,11
<i>Azotobacter</i> sp. LG66.14AR	32,54	<i>Beijerinckia</i> sp. 10.34R	22,96
<i>Azotobacter</i> sp. LG80.18AR	32,40	<i>Derxia</i> sp. LGD11.14	22,53
<i>Azotobacter</i> sp. LG82.18AR	31,35	<i>Azotobacter</i> sp. LG44.40AR	20,51
<i>Azotobacter</i> sp. LG7.8AR	30,77	<i>Azotobacter</i> sp. LG35.44AR	19,64
<i>Azotobacter</i> sp. LG44.10AR	30,30	<i>Derxia</i> sp. LGD38.36	19,64
<i>Beijerinckia</i> sp. 23.45R	29,75	<i>Beijerinckia</i> sp. 27.41R	17,90
<i>Azotobacter</i> sp. LG2.4AR	29,47	<i>Azotobacter</i> sp. LG30.67AR	17,76
<i>Azotobacter</i> sp. LG95.22AR	29,25	<i>Azotobacter</i> sp. LG18.9AR	17,62
<i>Derxia</i> sp. LGD5.58	28,89	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.54R	17,18
<i>Derxia</i> sp. LGD11.11	28,60	<i>Derxia</i> sp. LGD25.23	17,18
<i>Azotobacter</i> sp. LG84.19AR	28,41	<i>Derxia</i> sp. LGD34.33	16,75
<i>Derxia</i> sp. LGD29.27	28,31	<i>Beijerinckia</i> sp. 16.38R	16,60
<i>Beijerinckia</i> sp. 1.1R	28,16	<i>Azotobacter</i> sp. LG15.47AR	15,59
<i>Derxia</i> sp. LGD24.53	27,88	<i>Azotobacter</i> sp. LG38.72AR	15,59
<i>Beijerinckia</i> sp. 30.2R	27,59	<i>Beijerinckia</i> sp. 14.56R	15,30
<i>Derxia</i> sp. LGD42.49	27,59	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.50R	15,16
<i>Derxia</i> sp. LGD14.16	27,44	<i>Azotobacter</i> sp. LG35.45AR	15,01
<i>Derxia</i> sp. LGD46.48	27,44	<i>Azotobacter</i> sp. LG13.25AR	14,87
<i>Derxia</i> sp. LGD2.40	27,15	<i>Beijerinckia</i> sp. 2.4R	14,87
<i>Derxia</i> sp. LGD3.26	27,15	<i>Derxia</i> sp. LGD3.5	14,87
<i>Derxia</i> sp. LGD32.31	27,15	<i>Beijerinckia</i> sp. 23.47R	14,73
<i>Derxia</i> sp. LGD32.30	27,01	<i>Derxia</i> sp. LGD44.45	14,44
<i>Derxia</i> sp. LGD38.20	26,86	<i>Azotobacter</i> sp. LG30.68AR	14,00
<i>Azotobacter</i> sp. LG65.14AR	26,70	<i>Derxia</i> sp. LGD5.57	14,00
<i>Azotobacter</i> sp. LG63.13AR	26,60	<i>Beijerinckia</i> sp. 21.58R	13,71
<i>Azotobacter</i> sp. LG72.15AR	26,48	<i>Derxia</i> sp. LGD20.56	13,71
<i>Derxia</i> sp. LGD25.25	26,43	<i>Derxia</i> sp. LGD36.34	13,28
<i>Azotobacter</i> sp. LG83.19AR	26,07	<i>Azotobacter</i> sp. LG28.18AR	13,14
<i>Azotobacter</i> sp. LG 80.17AR	25,98	<i>Beijerinckia</i> sp. 49.7R	12,70
<i>Azotobacter</i> sp. LG63.13AR	25,78	<i>Derxia</i> sp. LGD45.47	12,70
<i>Azotobacter</i> sp. LG24.46AR	25,76	<i>Beijerinckia</i> sp. 5.32R	12,41

Continuación...

Bacterias rizosféricas aerobias	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias rizosféricas aerobias	Fósforo soluble (ppm)
<i>Derxia</i> sp. LGD14.63	12.41	<i>Beijerinckia</i> sp. 18.9R	3.02
<i>Beijerinckia</i> sp. 10.35R	11.98	<i>Beijerinckia</i> sp. 14.53R	2.88
<i>Azotobacter</i> sp. LG17.36AR	11.84	<i>Beijerinckia</i> sp. 45.22R	2.88
<i>Derxia</i> sp. LGD28.25	11.40	<i>Derxia</i> sp. LGD40.13	2.88
<i>Beijerinckia</i> sp. 27.43R	11.26	<i>Derxia</i> sp. LGD23.44	2.73
<i>Derxia</i> sp. LGD34.32	10.97	<i>Derxia</i> sp. LGD43.37	1.86
<i>Beijerinckia</i> sp. 49.1R	10.82	<i>Beijerinckia</i> sp. 5.33R	1.58
<i>Derxia</i> sp. LGD39.2	10.53	<i>Derxia</i> sp. LGD4.51	1.58
<i>Derxia</i> sp. LGD37.35	9.67	<i>Derxia</i> sp. LGD37.10	1.43
<i>Derxia</i> sp. LGD17.17	9.52	<i>Derxia</i> sp. LGD42.42	1.43
<i>Azotobacter</i> sp. LG32.65AR	9.09	<i>Derxia</i> sp. LGD42.47	1.43
<i>Derxia</i> sp. LGD42.48	7.64	<i>Azotobacter</i> sp. LG1.1AR	1.29
<i>Derxia</i> sp. LGD21.54	6.63	<i>Derxia</i> sp. LGD35.33	1.29
<i>Beijerinckia</i> sp. 17.36R	5.91	<i>Derxia</i> sp. LGD38.19	1.29
<i>Beijerinckia</i> sp. 13.52R	5.77	<i>Derxia</i> sp. LGD24.52	1.14
<i>Beijerinckia</i> sp. 39.23R	5.04	<i>Derxia</i> sp. LGD37.11	1.14
<i>Beijerinckia</i> sp. 15.41R	4.90	<i>Derxia</i> sp. LGD17.18	1.00
<i>Beijerinckia</i> sp. 17.35R	4.32	<i>Derxia</i> sp. LGD3.25	1.00
<i>Beijerinckia</i> sp. 13.51R	4.18	<i>Azotobacter</i> sp. LG28.19AR	0.85
<i>Beijerinckia</i> sp. 13.25R	3.74	<i>Azotobacter</i> sp. LG45.51AR	0.85
<i>Derxia</i> sp. LGD33.36	3.31	<i>Beijerinckia</i> sp. 35.4R	0.85
<i>Azotobacter</i> sp. LG9.56AR	3.02		

Tabla 12. Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias rizosféricas microaerófilas aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias rizosféricas microaerófilas	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias rizosféricas microaerófilas	Fósforo soluble (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb8RM	30.48	<i>Burkholderia</i> sp. JMV22RM	13.42
<i>Burkholderia</i> sp. JMV19RM	29.90	<i>Burkholderia</i> sp. JMV3RM	12.99
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17RM	28.89	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb6RM	12.99
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb12RM	27.59	<i>Azospirillum</i> sp. NFb26RM	12.85
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb9RM	27.15	<i>Azospirillum</i> sp. NFb31RM	12.85
<i>Burkholderia</i> sp. JMV16RM	27.01	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb31RM	12.70
<i>Azospirillum</i> sp. NFb20RM	24.99	<i>Azospirillum</i> sp. LGI30RM	12.41
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb27RM	24.41	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4RM	12.41
<i>Azospirillum</i> sp. LGI32RM	24.26	<i>Azospirillum</i> sp. LGI21RM	12.27
<i>Burkholderia</i> sp. JMV33RM	22.38	<i>Azospirillum</i> sp. NFb10RM	12.27
<i>Azospirillum</i> sp. LGI15RM	22.24	<i>Azospirillum</i> sp. NFb5RM	12.27
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb32RM	22.10	<i>Azospirillum</i> sp. NFb30RM	12.12
<i>Azospirillum</i> sp. LGI29RM	21.52	<i>Azospirillum</i> sp. NFb3RM	12.12
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb24RM	21.37	<i>Azospirillum</i> sp. NFb7RM	11.69
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb30RM	21.23	<i>Azospirillum</i> sp. LGI6RM	11.55
<i>Azospirillum</i> sp. LGI17RM	20.94	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11RM	11.55
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb28RM	20.65	<i>Azospirillum</i> sp. NFb28RM	11.55
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18RM	20.51	<i>Burkholderia</i> sp. JMV17RM	11.55
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2RM	20.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17RM	11.26
<i>Azospirillum</i> sp. LGI1RM	20.22	<i>Azospirillum</i> sp. NFb19RM	11.26
<i>Azospirillum</i> sp. LGI4RM	18.48	<i>Azospirillum</i> sp. NFb29RM	11.26
<i>Burkholderia</i> sp. JMV12RM	18.19	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb18RM	11.26
<i>Burkholderia</i> sp. JMV18RM	18.19	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb14RM	10.82
<i>Burkholderia</i> sp. JMV11RM	17.62	<i>Azospirillum</i> sp. NFb13RM	10.53
<i>Azospirillum</i> sp. LGI10RM	17.33	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27RM	10.53
<i>Burkholderia</i> sp. JMV27RM	16.75	<i>Azospirillum</i> sp. NFb14RM	10.25
<i>Azospirillum</i> sp. LGI11RM	16.03	<i>Azospirillum</i> sp. NFb15RM	9.38
<i>Burkholderia</i> sp. JMV25RM	15.45	<i>Azospirillum</i> sp. NFb1RM	8.95
<i>Burkholderia</i> sp. JMV6RM	15.45	<i>Burkholderia</i> sp. JMV10RM	8.08
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38RM	15.30	<i>Azospirillum</i> sp. NFb4RM	7.64
<i>Burkholderia</i> sp. JMV13RM	14.58	<i>Azospirillum</i> sp. NFb9RM	7.64
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21RM	13.42	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	7.64
<i>Azospirillum</i> sp. NFb23RM	13.42	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb36RM	7.36
<i>Azospirillum</i> sp. NFb8RM	13.42	<i>Azospirillum</i> sp. NFb25RM	6.92

Continuación...

Bacterias rizosféricas microaerófilas	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias rizosféricas microaerófilas	Fósforo soluble (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. LGI13RM	6.78	<i>Azospirillum</i> sp. LGI18RM	2.44
<i>Azospirillum</i> sp. LGI2RM	6.78	<i>Burkholderia</i> sp. JMV15RM	2.44
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb33RM	6.49	<i>Azospirillum</i> sp. LGI5RM	2.30
<i>Azospirillum</i> sp. NFb33RM	5.48	<i>Burkholderia</i> sp. JMV14RM	2.30
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb34RM	5.48	<i>Azospirillum</i> sp. NFb6RM	2.15
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb26RM	5.33	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21RM	2.15
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb11RM	5.04	<i>Burkholderia</i> sp. JMV1RM	2.01
<i>Burkholderia</i> sp. JMV7RM	4.75	<i>Azospirillum</i> sp. NFb12RM	1.72
<i>Azospirillum</i> sp. LGI8RM	4.18	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1RM	1.58
<i>Azospirillum</i> sp. LGI7RM	3.89	<i>Azospirillum</i> sp. LGI27RM	1.29
<i>Burkholderia</i> sp. JMV24RM	3.74	<i>Azospirillum</i> sp. LGI28RM	1.14
<i>Burkholderia</i> sp. JMV2RM	3.60	<i>Azospirillum</i> sp. NFb24RM	1.14
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7RM	3.45	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15RM	1.14
<i>Azospirillum</i> sp. LGI16RM	3.02	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb29RM	1.00
<i>Azospirillum</i> sp. LGI31RM	2.88	<i>Azospirillum</i> sp. LGI9RM	0.85
<i>Azospirillum</i> sp. LGI22RM	2.59	<i>Azospirillum</i> sp. LGI19RM	0.71
<i>Burkholderia</i> sp. JMV20RM	2.59		

El 100% (190) de cultivos de bacterias endófitas: 42,1% (80) de raíces y 57,9% (110) de tallos y 100% (212) de bacterias rizosféricas: 52,4% (111) aerobias y 47,6% (101) microaerófilas produjeron indoles *in vitro*, evidenciados por una coloración grosella (Figura 60). Los rangos en la concentración de indoles, alcanzados con las bacterias endófitas (Tablas 13,14) fueron de 15,80-46,91ppm (raíces), 18-195,8ppm (tallos) y con las bacterias rizosféricas (Tablas 15,16) fueron de 15,8-53,58ppm (aerobias) y 15,8-199,02ppm (microaerófilas).

4. 5 Bacterias endófitas y rizosféricas seleccionadas

Los cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas fueron cinco, correspondientes a los valores máximos en la concentración de amonio (dos cultivos de bacterias endófitas aisladas de raíz y tallo) y mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles (dos cultivos de bacterias endófitas aisladas de raíz y tallo y una rizosférica aerobia). Los cultivos bacterianos se identificaron fenotípicamente como *Herbaspirillum* sp.19ER y *Azospirillum* sp.23ET con 37,52 y 29,25ppm de amonio; *Herbaspirillum* sp.23ER con 25,94ppm de amonio, 24,84ppm de fósforo soluble y 46,91ppm de indoles; *Azospirillum* sp.3ET con 17,85ppm de amonio, 29,75ppm de fósforo soluble y 89,13ppm de indoles y *Azotobacter* sp.16.28AR con 35,69ppm de amonio, 34,53ppm de fósforo soluble y 22,47ppm de indoles (Tabla 17).

4.6 Efecto de bacterias endófitas y rizosféricas en *Asparagus officinalis* L.

Los valores de altura y número de tallos de las plantas de espárrago presentaron distribución normal ($p>0,05$) y homogeneidad de varianza ($p>0,05$), por lo que se realizó el análisis de varianza de un solo factor y la prueba múltiple de Tukey (Anexos 7 a 12). La altura de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 48,33-66,0cm con las bacterias endófitas y rizosféricas; 37,0cm en el testigo absoluto y 51,0cm en el testigo químico (Figuras 61 a 63), registrándose índices de efectividad de 30,62% con *Herbaspirillum* sp.JNFb23ER y 78,37% con *Azospirillum* sp.NFb3ET (Tabla 18).



Figura 60. Coloración observada en la cuantificación de indoles.

Tabla 13. Indoles producidos (ppm) por bacterias endófitas aisladas de raíces de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias endófitas	Indoles (ppm)	Bacterias endófitas	Indoles (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb23ER	46.91	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P45ER	24.69
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb19ER	40.24	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P47ER	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. NFb26ER	35.80	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15ER	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. NFb28ER	35.80	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1ER	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV25ER	35.80	<i>Azospirillum</i> sp. LGI2ER	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb32ER	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. LGI64ER	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV24ER	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. LGI7ER	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV18ER	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFb16ER	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV7ER	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFb24ER	22.47
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P53ER	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFb29ER	22.47
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb26ER	31.36	<i>Burkholderia</i> sp. JMV10ER	22.47
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb34ER	31.36	<i>Burkholderia</i> sp. JMV15ER	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. LGI39ER	29.13	<i>Burkholderia</i> sp. JMV2ER	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb17ER	29.13	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P49ER	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21ER	29.13	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4ER	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb33ER	29.13	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb5ER	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV17ER	29.13	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11ER	20.24
<i>Burkholderia</i> sp. JMV5ER	29.13	<i>Azospirillum</i> sp. NFb12ER	20.24
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P52ER	29.13	<i>Azospirillum</i> sp. NFb14ER	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI15ER	26.91	<i>Azospirillum</i> sp. NFb35ER	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI51ER	26.91	<i>Azospirillum</i> sp. NFb38ER	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI61ER	26.91	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P2ER	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18ER	26.91	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P33ER	20.24
<i>Burkholderia</i> sp. JMV21ER	26.91	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P48ER	20.24
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P6ER	26.91	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P50ER	20.24
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb25ER	26.91	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17ER	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI10ER	24.69	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20ER	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI1ER	24.69	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7ER	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI3ER	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. LGI28ER	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. LGI9ER	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27ER	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. NFb25ER	24.69	<i>Burkholderia</i> sp. JMV13ER	18.02
<i>Burkholderia</i> sp. JMV12ER	24.69	<i>Burkholderia</i> sp. JMV6ER	18.02
<i>Burkholderia</i> sp. JMV16ER	24.69	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P13ER	18.02
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P1ER	24.69	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P22ER	18.02

Continuación...

Bacterias endófitas	Indoles (ppm)	Bacterias endófitas	Indoles (ppm)
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P51ER	18.02	<i>Azospirillum</i> sp. NFb19ER	15.80
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P8ER	18.02	<i>Azospirillum</i> sp. NFb22ER	15.80
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22aER	18.02	<i>Azospirillum</i> sp. NFb30ER	15.80
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22bER	18.02	<i>Burkholderia</i> sp. JMV9ER	15.80
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2ER	18.02	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb27ER	15.80
<i>Azospirillum</i> sp. LGI13ER	15.80	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb37ER	15.80

Tabla 14. Indoles producidos (ppm) por bacterias endófitas aisladas de tallos de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias endófitas	Indoles (ppm)	Bacterias endófitas	Indoles (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. LGI23ET	195.80	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb8ET	31.36
<i>Azospirillum</i> sp. NFB3ET	89.13	<i>Azospirillum</i> sp. LGI17ET	29.13
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22ET	44.69	<i>Azospirillum</i> sp. LGI1ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. NFB43ET	40.24	<i>Azospirillum</i> sp. LGI26ET	29.13
<i>Burkholderia</i> sp. JMV17ET	40.24	<i>Azospirillum</i> sp. LGI29ET	29.13
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2ET	40.24	<i>Azospirillum</i> sp. LGI7ET	29.13
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb9ET	40.24	<i>Azospirillum</i> sp. LGI8ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. NFB13ET	38.02	<i>Azospirillum</i> sp. NFB28ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. NFB4ET	38.02	<i>Azospirillum</i> sp. NFB2ET	29.13
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb19ET	38.02	<i>Burkholderia</i> sp. JMV11ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. NFB5ET	35.80	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21ET	29.13
<i>Burkholderia</i> sp. JMV2ET	35.80	<i>Burkholderia</i> sp. JMV22ET	29.13
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4ET	35.80	<i>Burkholderia</i> sp. JMV23ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. LGI2ET	33.58	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. LGI5ET	33.58	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb23ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. NFB20ET	33.58	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb24ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. NFB29ET	33.58	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb5ET	29.13
<i>Azospirillum</i> sp. NFB30ET	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. LGI13ET	26.91
<i>Burkholderia</i> sp. JMV30ET	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. LGI19ET	26.91
<i>Burkholderia</i> sp. JMV7ET	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. NFB10ET	26.91
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb10ET	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. NFB11ET	26.91
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb14ET	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. NFB22ET	26.91
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb16ET	33.58	<i>Azospirillum</i> sp. NFB24ET	26.91
<i>Azospirillum</i> sp. LGI18ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFB31ET	26.91
<i>Azospirillum</i> sp. LGI27ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFB35ET	26.91
<i>Azospirillum</i> sp. NFB14ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFB37ET	26.91
<i>Azospirillum</i> sp. NFB15ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFB42ET	26.91
<i>Azospirillum</i> sp. NFB27ET	31.36	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17ET	26.91
<i>Azospirillum</i> sp. NFB33ET	31.36	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb18ET	26.91
<i>Azospirillum</i> sp. NFB38ET	31.36	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20ET	26.91
<i>Burkholderia</i> sp. JMV32ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. LGI12ET	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV6ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. LGI20ET	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV9ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. LGI3ET	24.69
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb13ET	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. NFB12ET	24.69

Continuación...

Bacterias endófitas	Indoles (ppm)	Bacterias endófitas	Indoles (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. NFb21ET	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb1ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. NFb26ET	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb23ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. NFb36ET	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb25ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. NFb40ET	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb34ET	24.69	<i>Burkholderia</i> sp. JMV 16ET	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb39ET	24.69	<i>Burkholderia</i> sp. JMV13ET	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb8ET	24.69	<i>Burkholderia</i> sp. JMV18ET	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV14ET	24.69	<i>Burkholderia</i> sp. JMV1ET	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV15ET	24.69	<i>Burkholderia</i> sp. JMV8ET	22.47
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb21ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. LGI16ET	20.24
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb3ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. LGI24ET	20.24
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb6ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. LGI33ET	20.24
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7ET	24.69	<i>Azospirillum</i> sp. LGI4ET	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI10ET	22.47	<i>Azospirillum</i> sp. NFb32ET	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI14ET	22.47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV10ET	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI15ET	22.47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV19ET	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI21ET	22.47	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb11ET	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI22ET	22.47	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1ET	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI6ET	22.47	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17ET	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. LGI9ET	22.47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV4ET	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. NFb16ET	22.47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV5ET	18.02

Tabla 15. Indoles producidos (ppm) por bacterias rizosféricas aerobias aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias rizosféricas aerobias	Indoles (ppm)	Bacterias rizosféricas aerobias	Indoles (ppm)
<i>Derxia</i> sp. LGD28.25	53.58	<i>Beijerinckia</i> sp. 14.53R	24.69
<i>Azotobacter</i> sp. LG12.17AR	46.91	<i>Beijerinckia</i> sp. 17.35R	24.69
<i>Beijerinckia</i> sp. 10.34R	44.69	<i>Derxia</i> sp. LGD17.18	24.69
<i>Derxia</i> sp. LGD38.19	44.69	<i>Derxia</i> sp. LGD25.23	24.69
<i>Azotobacter</i> sp. LG80.18AR	42.47	<i>Derxia</i> sp. LGD29.27	24.69
<i>Azotobacter</i> sp. LG66.14AR	35.80	<i>Derxia</i> sp. LGD42.42	24.69
<i>Beijerinckia</i> sp. 13.54R	35.80	<i>Derxia</i> sp. LGD43.37	24.69
<i>Azotobacter</i> sp. LG7.8AR	33.58	<i>Azotobacter</i> sp. LG24.46AR	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG84.19AR	33.58	<i>Azotobacter</i> sp. LG63.13AR	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 13.52R	33.58	<i>Azotobacter</i> sp. LG72.15AR	22.47
<i>Derxia</i> sp. LGD37.35	33.58	<i>Azotobacter</i> sp. LG1.1AR	22.47
<i>Derxia</i> sp. LGD39.2	33.58	<i>Azotobacter</i> sp. LG15.47AR	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG82.18AR	31.36	<i>Azotobacter</i> sp. LG16.28AR	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG13.25AR	31.36	<i>Azotobacter</i> sp. LG17.36AR	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG2.4AR	31.36	<i>Azotobacter</i> sp. LG32.65AR	22.47
<i>Derxia</i> sp. LGD2.40	31.36	<i>Azotobacter</i> sp. LG95.22AR	22.47
<i>Derxia</i> sp. LGD35.4	31.36	<i>Beijerinckia</i> sp. 1.1R	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG30.67AR	29.13	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.25R	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 10.27R	29.13	<i>Beijerinckia</i> sp. 17.36R	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 10.35R	29.13	<i>Beijerinckia</i> sp. 2.4R	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 30.2R	29.13	<i>Beijerinckia</i> sp. 23.45R	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 35.4R	29.13	<i>Beijerinckia</i> sp. 27.41R	22.47
<i>Derxia</i> sp. LGD35.33	29.13	<i>Beijerinckia</i> sp. 49.1R	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG35.44AR	26.91	<i>Derxia</i> sp. LGD11.11	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 15.41R	26.91	<i>Derxia</i> sp. LGD21.54	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 23.47R	26.91	<i>Derxia</i> sp. LGD24.52	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 39.23R	26.91	<i>Derxia</i> sp. LGD25.25	22.47
<i>Beijerinckia</i> sp. 5.33R	26.91	<i>Derxia</i> sp. LGD3.26	22.47
<i>Derxia</i> sp. LGD23.44	26.91	<i>Derxia</i> sp. LGD3.5	22.47
<i>Derxia</i> sp. LGD38.36	26.91	<i>Derxia</i> sp. LGD32.30	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG63.13AR	24.69	<i>Derxia</i> sp. LGD33.36	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG30.68AR	24.69	<i>Derxia</i> sp. LGD37.10	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG44.40AR	24.69	<i>Derxia</i> sp. LGD37.11	22.47
<i>Azotobacter</i> sp. LG9.56AR	24.69	<i>Derxia</i> sp. LGD38.20	22.47

Continuación...

Bacterias rizoféricas aerobias	Indoles (ppm)	Bacterias rizoféricas aerobias	Indoles (ppm)
<i>Derxia</i> sp. LGD42.47	22.47	<i>Derxia</i> sp. LGD24.53	20.24
<i>Derxia</i> sp. LGD44.45	22.47	<i>Derxia</i> sp. LGD3.25	20.24
<i>Derxia</i> sp. LGD44.55	22.47	<i>Derxia</i> sp. LGD32.31	20.24
<i>Derxia</i> sp. LGD45.47	22.47	<i>Derxia</i> sp. LGD4.51	20.24
<i>Derxia</i> sp. LGD5.58	22.47	<i>Derxia</i> sp. LGD40.13	20.24
<i>Azotobacter</i> sp. LG83.19AR	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD42.48	20.24
<i>Azotobacter</i> sp. LG 80.17AR	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD5.57	20.24
<i>Azotobacter</i> sp. LG18.9AR	20.24	<i>Azotobacter</i> sp. LG44.10AR	18.02
<i>Azotobacter</i> sp. LG28.19AR	20.24	<i>Azotobacter</i> sp. LG28.18AR	18.02
<i>Azotobacter</i> sp. LG35.45AR	20.24	<i>Beijerinckia</i> sp. 16.38R	18.02
<i>Azotobacter</i> sp. LG38.72AR	20.24	<i>Beijerinckia</i> sp. 21.58R	18.02
<i>Azotobacter</i> sp. LG45.51AR	20.24	<i>Beijerinckia</i> sp. 45.22R	18.02
<i>Azotobacter</i> sp. LG95.21AR	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD14.63	18.02
<i>Beijerinckia</i> sp. 13.51R	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD34.32	18.02
<i>Beijerinckia</i> sp. 18.9R	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD34.33	18.02
<i>Beijerinckia</i> sp. 27.43R	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD36.34	18.02
<i>Beijerinckia</i> sp. 49.7R	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD42.49	18.02
<i>Beijerinckia</i> sp. 5.32R	20.24	<i>Derxia</i> sp. LGD46.48	18.02
<i>Derxia</i> sp. LGD11.14	20.24	<i>Azotobacter</i> sp. LG65.14AR	15.80
<i>Derxia</i> sp. LGD14.16	20.24	<i>Beijerinckia</i> sp. 13.50R	15.80
<i>Derxia</i> sp. LGD17.17	20.24	<i>Beijerinckia</i> sp. 14.56R	15.80
<i>Derxia</i> sp. LGD20.56	20.24		

Tabla 16. Indoles producidos (ppm) por bacterias rizosféricas microaerófilas aisladas de *Asparagus officinalis* L.

Bacterias rizosféricas microaerófilas	Indoles (ppm)	Bacterias rizosféricas microaerófilas	Indoles (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. NFb15RM	199.02	<i>Azospirillum</i> sp. LGI8RM	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV33RM	198.02	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11RM	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV14RM	166.02	<i>Azospirillum</i> sp. NFb12RM	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV12RM	160.24	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17RM	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. LGI16RM	104.69	<i>Azospirillum</i> sp. NFb19RM	24.69
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb17RM	104.69	<i>Azospirillum</i> sp. NFb21RM	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. NFb13RM	42.47	<i>Azospirillum</i> sp. NFb28RM	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV7RM	40.24	<i>Azospirillum</i> sp. NFb3RM	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. LGI21RM	35.80	<i>Burkholderia</i> sp. JMV11RM	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. NFb9RM	35.80	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb27RM	24.69
<i>Burkholderia</i> sp. JMV10RM	35.80	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb30RM	24.69
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb14RM	35.80	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb34RM	24.69
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb8RM	33.58	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb7RM	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. LGI10RM	31.36	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb9RM	24.69
<i>Azospirillum</i> sp. LGI4RM	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. LGI18RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb18RM	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. LGI27RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb23RM	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. LGI31RM	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV13RM	31.36	<i>Azospirillum</i> sp. LGI6RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. LGI17RM	29.13	<i>Azospirillum</i> sp. NFb10RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb5RM	29.13	<i>Azospirillum</i> sp. NFb26RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. LGI2RM	26.91	<i>Azospirillum</i> sp. NFb31RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb20RM	26.91	<i>Azospirillum</i> sp. NFb4RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb29RM	26.91	<i>Burkholderia</i> sp. JMV18RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb30RM	26.91	<i>Burkholderia</i> sp. JMV20RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. NFb8RM	26.91	<i>Burkholderia</i> sp. JMV22RM	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV16RM	26.91	<i>Burkholderia</i> sp. JMV24RM	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1RM	26.91	<i>Burkholderia</i> sp. JMV2RM	22.47
<i>Burkholderia</i> sp. JMV21RM	26.91	<i>Burkholderia</i> sp. JMV6RM	22.47
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb11RM	26.91	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb12RM	22.47
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15RM	26.91	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb18RM	22.47
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb1RM	26.91	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	22.47
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb28RM	26.91	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb26RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38RM	24.69	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb33RM	22.47
<i>Azospirillum</i> sp. LGI7RM	24.69	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb36RM	22.47

Continuación...

Bacterias rizoféricas microaerófilas	Indoles (ppm)	Bacterias rizosféricas microaerófilas	Indoles (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb4RM	22.47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV19RM	20.24
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb6RM	22.47	<i>Burkholderia</i> sp. JMV25RM	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI11RM	20.24	<i>Burkholderia</i> sp. JMV27RM	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI13RM	20.24	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb24RM	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI15RM	20.24	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb29RM	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI19RM	20.24	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb31RM	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI1RM	20.24	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb32RM	20.24
<i>Azospirillum</i> sp. LGI22RM	20.24	<i>Azospirillum</i> sp. LGI28RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. LGI30RM	20.24	<i>Azospirillum</i> sp. LGI29RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. LGI5RM	20.24	<i>Azospirillum</i> sp. LGI32RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. LGI9RM	20.24	<i>Azospirillum</i> sp. NFb6RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. NFb14RM	20.24	<i>Burkholderia</i> sp. JMV15RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. NFb1RM	20.24	<i>Burkholderia</i> sp. JMV17RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. NFb25RM	20.24	<i>Burkholderia</i> sp. JMV3RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. NFb27RM	20.24	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb2RM	18.02
<i>Azospirillum</i> sp. NFb33RM	20.24	<i>Azospirillum</i> sp. NFb24RM	15.80
<i>Azospirillum</i> sp. NFb7RM	20.24		

Tabla 17. Características de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas e identificadas en *Asparagus officinalis* L.

Género de bacterias	Procedencia	Amonio (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Indoles (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp.19ER	Raíz	37,52	1,29	40,24
<i>Azospirillum</i> sp.23ET	Tallo	29,25	18,63	195,80
<i>Herbaspirillum</i> sp.23ER	Raíz	25,94	24,84	46,91
<i>Azospirillum</i> sp.3ET	Tallo	17,85	29,75	89,13
<i>Azotobacter</i> sp.16.28AR	Rizósfera	35,69	34,53	22,47



Figura 61. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azospirillum* sp.NFb3ET.



Figura 62. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Herbaspirillum* sp.JNFb19ER.

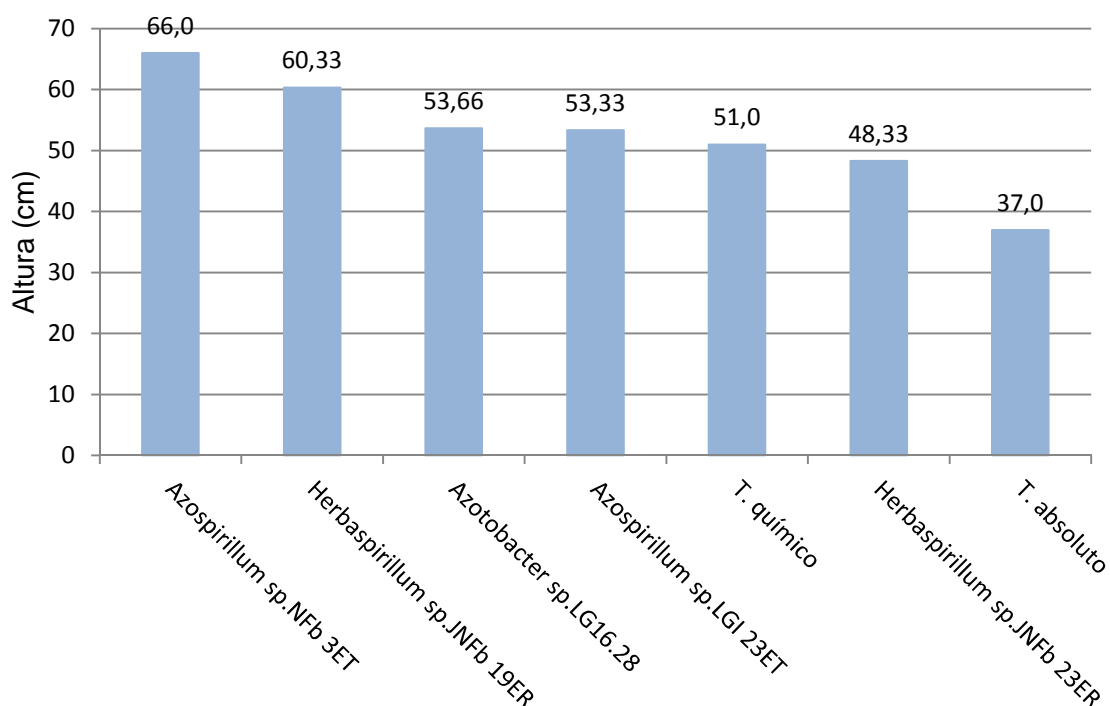


Figura 63. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.

Tabla 18. Índices de efectividad (%) de bacterias endófitas y rizosféricas en la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días

Tratamientos	IE%		
	30 días	45 días	60 días
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 19ER	63,05	51,16	32,72
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 23ER	30,62	26,34	7,87
<i>Azospirillum</i> sp.NFb 3ET	78,37	59,67	46,05
<i>Azospirillum</i> sp.LGI 23ET	44,13	48,83	47,27
<i>Azotobacter</i> sp.LG 16.28AR	45,02	35,65	32,10
Testigo químico	37,83	33,32	22,41

El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.NFb3ET, diferenciándose significativamente de los testigos químico y absoluto (Tabla 19).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 2,33-5,0 con las bacterias endófitas y rizosféricas; 1,33 tallos en el testigo absoluto y 1,66 en el testigo químico (Figura 64), registrándose índices de efectividad de 75,18% con *Azotobacter* sp.LG16.28AR y 275,93% con *Azospirillum* sp.NFb3ET (Tabla 20). El análisis de varianza del número de tallos demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.NFb3ET no diferenciándose significativamente de *Herbaspirillum* spp.JNFb19ER, JNFb23ER y *Azospirillum* sp.LGI23ET, pero si de *Azotobacter* sp.LG16.28AR y testigos químico y absoluto (Tabla 21, anexo 7).

La altura de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 54,33-68,66cm con las bacterias endófitas y rizosféricas; 43,0cm en el testigo absoluto y 57,33cm en el testigo químico (Figuras 65 a 68), registrándose índices de efectividad de 26,34% con *Herbaspirillum* sp.JNFb23ER y 59,67% con *Azospirillum* sp.NFb3ET (Tabla 18). El análisis de varianza de los valores de altura demostró significancia (Anexo 8) y según la prueba múltiple de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Azospirillum* spp. NFb3ET y LGI23ET y *Herbaspirillum* sp.JNFb19ER, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 19).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 3,66-5,33 con las bacterias endófitas y rizosféricas; 2,0 tallos en el testigo absoluto y 2,66 tallos en el testigo químico (Figura 69), registrándose índices de efectividad de 83,0% con *Azotobacter* sp.LG16.28 y 166,5% con *Azospirillum* sp.NFb3ET (Tabla 20). El análisis de varianza del número de tallos demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey los mayores valores correspondieron a las bacterias, diferenciándose significativamente de los testigos químico y absoluto (Tabla 21).

Tabla 19. Prueba de Tukey de la altura de plantas de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas

Tratamientos	Altura (cm)					
	30 días	Sign	45 días	Sign	60 días	Sign.
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 19ER	60,33	ab	65,00	a	73,00	b
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 23ER	48,33	c	54,33	c	59,33	c
<i>Azospirillum</i> sp.NFb 3ET	66,00	a	68,66	a	80,33	a
<i>Azospirillum</i> sp.LGI 23ET	53,33	abc	64,00	ab	81,00	a
<i>Azotobacter</i> sp.LG 16.28AR	53,66	abc	58,33	bc	72,66	b
T. absoluto	37,00	d	43,00	d	55,00	c
T. químico	51,00	bc	57,33	c	67,33	c

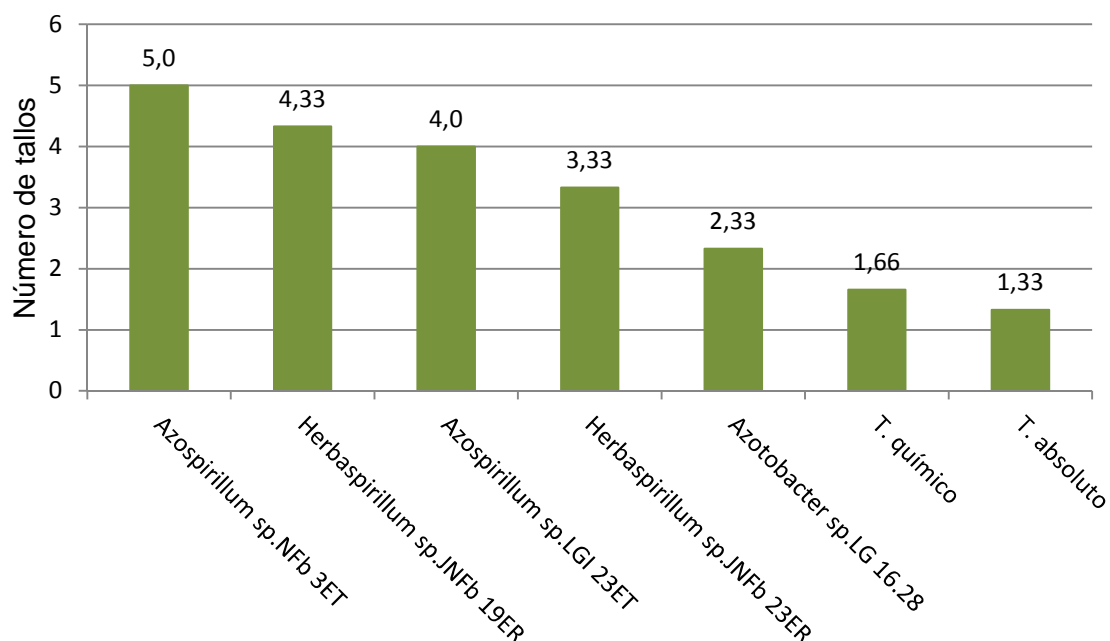


Figura 64. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.

Tabla 20. Índices de efectividad (%) de bacterias endófitas y rizosféricas en el número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días

Tratamientos	IE%		
	30 días	45 días	60 días
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 19ER	225,56	150,00	137,96
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 23ER	150,37	133,00	87,96
<i>Azospirillum</i> sp.NFb 3ET	275,93	166,50	175,56
<i>Azospirillum</i> sp.LGI 23ET	200,75	133,00	100,37
<i>Azotobacter</i> sp.LG 16.28AR	75,18	83,00	137,96
Testigo químico	24,8	33,00	37,59

Tabla 21. Prueba de Tukey del número de tallos de plantas de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas

Tratamientos	Tallos (número)					
	30 días	Sign	45 días	Sign	60 días	Sign.
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 19ER	4,33	ab	5,0	a	6,33	ab
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb 23ER	3,33	abc	4,66	a	5,00	bc
<i>Azospirillum</i> sp.NFb 3ET	5,0	a	5,33	a	7,33	a
<i>Azospirillum</i> sp.LGI 23ET	4,0	ab	4,66	a	5,33	bc
<i>Azotobacter</i> sp.LG 16.28AR	2,33	bc	3,66	ab	6,33	ab
T. absoluto	1,33	c	2,0	b	2,66	d
T. químico	1,66	c	2,66	b	3,66	dc



Figura 65. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azospirillum* sp. NFb3ET.



Figura 66. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Herbaspirillum* sp. JNFb19ER.



Figura 67. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp.LG16.28.

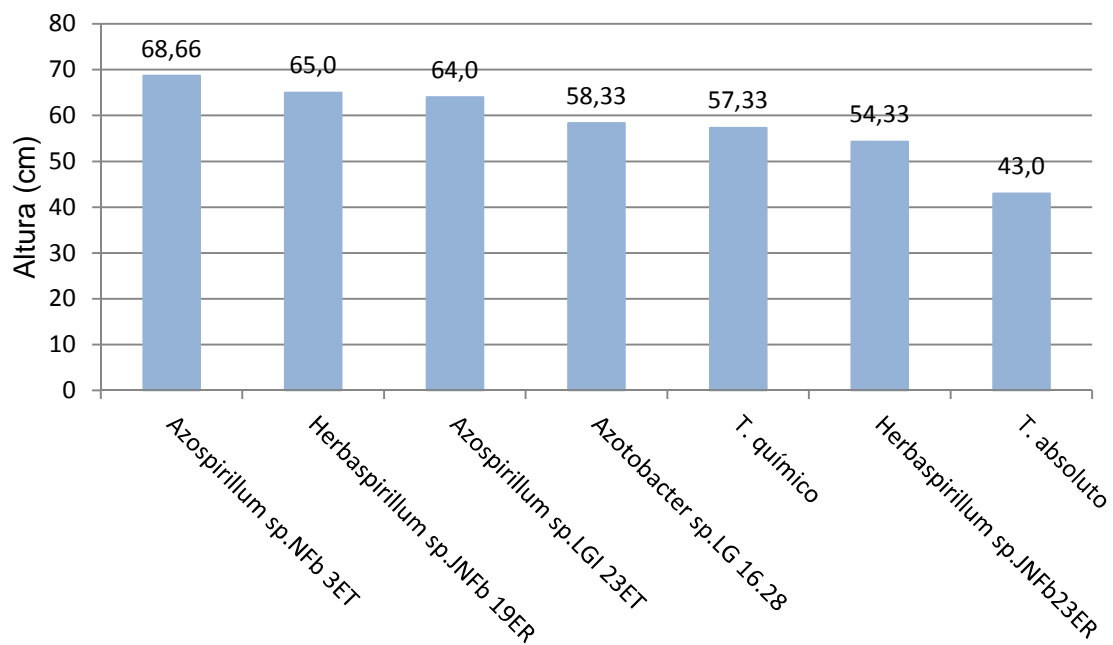


Figura 68. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.

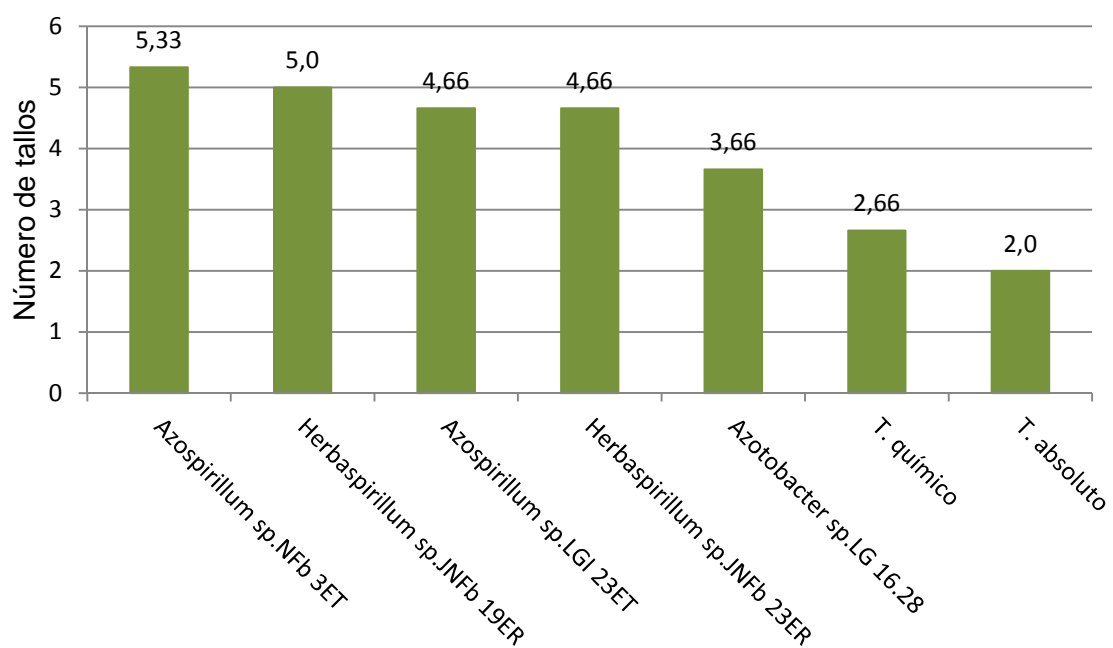


Figura 69. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.

La altura de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 59,33-81,0cm con las bacterias endófitas y rizosféricas; 55,0cm en el testigo absoluto y 67,33cm en el testigo químico (Figuras 70 a 72), registrándose índices de efectividad de 7,87% con *Herbaspirillum* sp.JNFb23ER y 47,27% con *Azospirillum* sp.LGI23ET (Tabla 18). El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia (Anexo 9) y según la prueba múltiple de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Azospirillum* spp. LGI23ET y NFb3ET, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 19).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 5,0-7,33 con las bacterias endófitas y rizosféricas; 2,66 tallos en el testigo absoluto y 3,66 tallos en el testigo químico (Figura 73), registrándose índices de efectividad de 87,96% con *Herbaspirillum* sp.JNFb23ER y 175,56% con *Azospirillum* sp.NFb3ET (Tabla 20). El análisis de varianza de los valores de número de tallos demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.NFb3ET, no diferenciándose significativamente de *Herbaspirillum* sp. JNFb19ER y *Azotobacter* sp.LG16.28AR, pero si de los demás tratamientos (Tabla 21).



Figura 70. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azospirillum* sp. NFB3ET.



Figura 71. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la inoculación y siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. LG16.28.

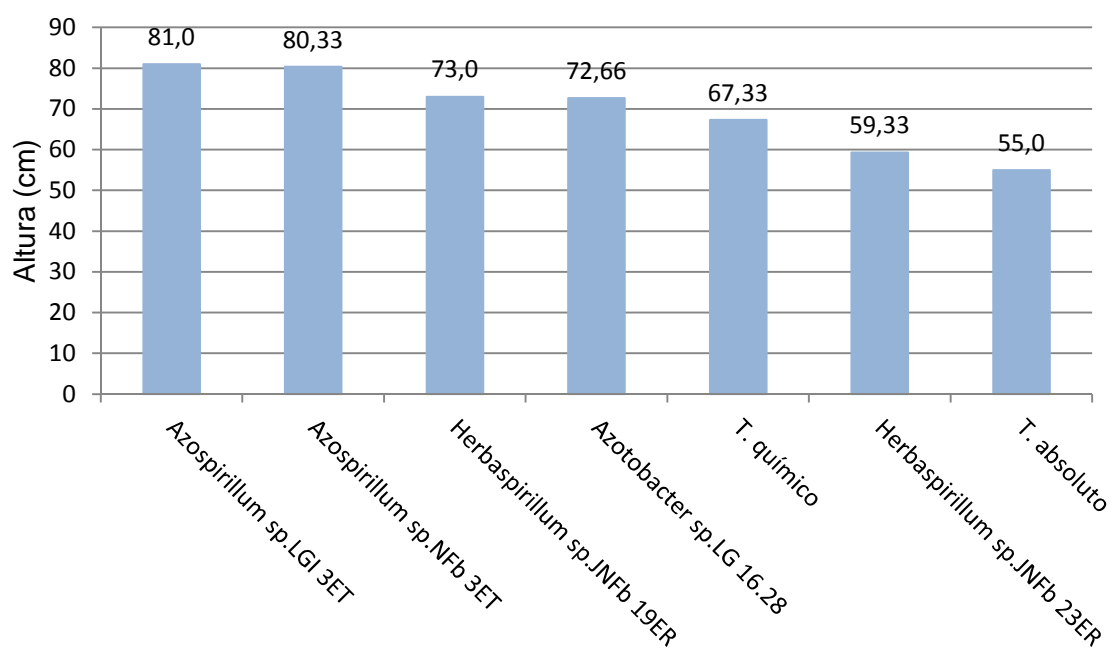


Figura 72. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.

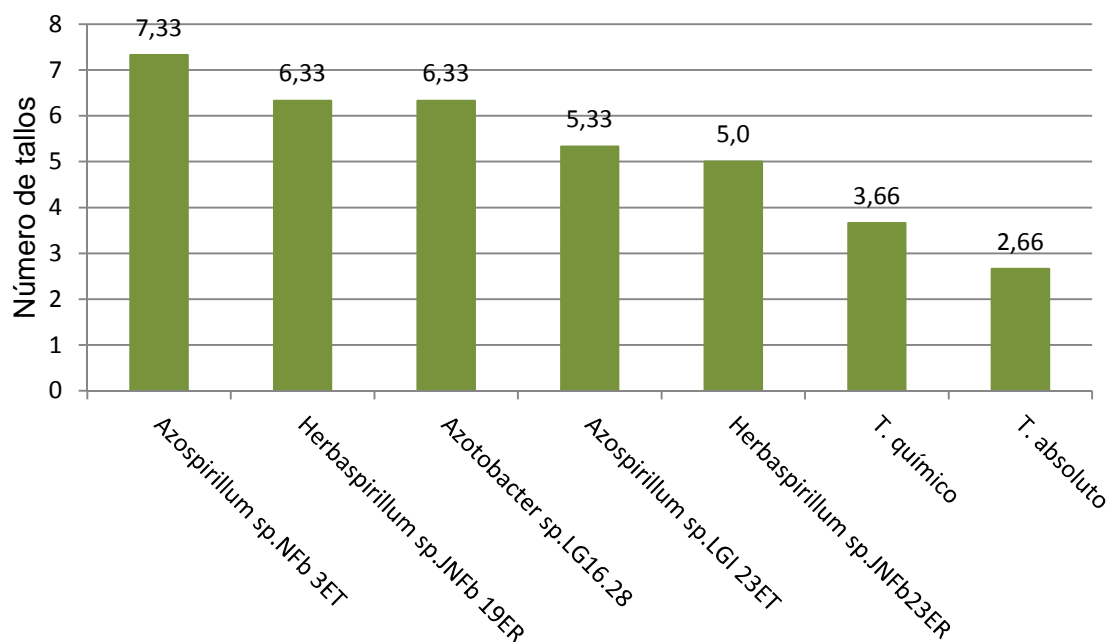


Figura 73. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas y rizosféricas.

V. DISCUSIÓN

En medios de cultivo sin nitrógeno semisólidos se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno en los que las bacterias reducen el nitrógeno atmosférico, en una reacción catalizada por el complejo nitrogenasa, utilizando una fuente de carbono como donador de electrones (Coyne, 2000). Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes pueden ser endófitas y rizosféricas, es decir pueden encontrarse en el interior de los tejidos o en el suelo rizosférico. Según el requerimiento de oxígeno, las endófitas son microaerófilas y las rizosféricas pueden ser aerobias y microaerófilas (Altamirano et al., 2014).

Las bacterias endófitas se aislaron de raíces y tallos previamente desinfectados, coincidiendo con Altamirano et al. (2014) y Hernández (2015), aunque también se puede aislar de hojas (Dibut et al., 2005). El término endófito hace referencia a las bacterias aisladas de tejidos desinfectados superficialmente y que no causan enfermedad visible a la planta hospedadora (Hallmann et al., 1997, mencionados por Mano & Morisaki, 2008). Las bacterias endófitas pueden ser obligadas, cuando dependen del huésped para su crecimiento, sobrevivencia y dispersión y facultativas cuando cumplen una etapa de su ciclo fuera del hospedero, generalmente en el suelo, por lo que allí se encuentra la mayor fuente de bacterias endófitas y generalmente es donde empieza el proceso de colonización (Hardoim et al., 2008; Beracochea, 2011).

Las bacterias rizosféricas se aislaron de las raíces y el suelo adherido o rizósfera, coincidiendo con Ramírez & Ugaz (2014) y Corrales & Lumbres (2017), aunque también se pueden aislar solo del suelo rizosférico removido de las raíces (Cárdenas et al., 2010). La porción de suelo bajo la influencia directa de las raíces de las plantas se denomina rizósfera y en la práctica comprende las

partículas de suelo que se encuentran firmemente adheridas a la superficie radicular, en un espacio de unos pocos milímetros alrededor de las raíces (Marrero et al., 2015). El rizoplaneo comprende la zona inmediatamente exterior a la epidermis radicular. En la rizósfera y rizoplaneo existe una intensa actividad microbiana, gracias a los compuestos de la materia orgánica del suelo y exudados de las plantas (Zahar et al., 2008).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas se enriquecieron y evidenciaron en medios semisólidos sin nitrógeno, que proveen un ambiente con la presión de oxígeno necesaria para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno (Beracochea, 2011). Investigadores como Baca et al., 2010 (arroz y tomate); Casos & Santiago, 2013 (malezas); Altamirano & Plasencia, 2014 (maíz) y Hernández, 2015 (arroz) también utilizaron medios semisólidos sin nitrógeno para evidenciar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, reconocidas por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio de cultivo. Según Massena et al. (2011) bajo la gradiente de oxígeno formada en los medios semisólidos, los diazótrofos con aerotaxis se mueven hacia la región del medio donde la respiración está en equilibrio con la tasa de difusión de oxígeno y forman una película de aproximadamente 5mm bajo la superficie, pudiendo desplazarse hacia la superficie cuando el número de células se incrementa o después de más de 10 días de incubación (Koomnok et al., 2007).

Los medios de cultivo en los que se enriquecieron y aislaron las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas: NFb y LGI (*Azospirillum* spp.), JNFb (*Herbaspirillum* spp.), LGI-P (*Gluconacetobacter* spp.) y JMV (*Burkholderia* spp.), fueron previamente utilizados por Altamirano & Plasencia (2014) en maíz. La frecuencia de muestras de raíces y tallos positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas disminuyó conforme los subcultivos en los medios semisólidos, coincidiendo con Altamirano & Plasencia (2014), Ramirez & Ugaz (2014) y Hernández (2015). Los medios semisólidos utilizados en la presente investigación son semiselectivos y contienen trazas de nitrógeno, provenientes de los reactivos y del agua destilada, que posibilitan el crecimiento de organismos no fijadores de nitrógeno. Por esta razón, deben realizarse subcultivos sucesivos para evitar el crecimiento de contaminantes y minimizar la ocurrencia de falsos positivos (Menezes, 2009), tal como lo reportaron Koomnok

et al. (2007) quienes aislaron bacterias formadoras de película subsuperficial en NFb; no obstante, éstas no demostraron la diazotrofia *in vitro* en la prueba de reducción del acetileno.

Las bacterias microaerófilas se aislaron en los medios sólidos con similar composición a los medios semisólidos. De igual manera, Sánchez (2008) observó el desarrollo de la película aerotóxica de bacterias diazotróficas bajo la superficie de medios semisólidos y en los mismos medios sólidos las bacterias desarrollaron normalmente en la superficie, evidenciando su condición de microaerófilas facultativas. La mayor frecuencia de raíces (33,3%), tallos (63,5%) y raíces con suelo rizosférico (47,1%) con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas y el mayor porcentaje de los cultivos de estas bacterias correspondieron al medio NFb, coincidiendo con Altamirano & Plasencia (2014), Hernández (2015) y Ramírez & Ugaz (2014), quienes procesaron muestras de raíces de maíz, tallos y hojas de arroz y raíz con suelo rizosférico de arroz, respectivamente.

La mayor frecuencia (78,1%) de raíces con suelo rizosférico de espárrago con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias y el mayor porcentaje (42,3%) de estas bacterias correspondieron al medio LGD; diferenciándose de Corrales & Lumbres (2017), quienes trabajaron con verdolaga y reportaron que los mayores valores (62,9 y 47,1%) correspondieron al medio LG. Estos resultados pueden ser explicados por el pH del suelo de procedencia de las muestras. En la presente investigación fue ligeramente ácido (6.5) y en el suelo de verdolaga fuertemente alcalino (9,3). Según Coyne (2000) bacterias del género *Azotobacter*, que son aisladas en medio LG, crecen mejor en suelos neutros o alcalinos y los géneros *Derxia* y *Beijerinckia*, que son aislados en el medio LGD y *Beijerinckia*, ocupan el lugar de *Azotobacter* en los suelos ácidos.

En el aislamiento se obtuvieron 402 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno: 190 endófitas de raíces (80) y tallos (110) y 212 rizosféricas: aerobias (111) y microaerófilas (101). La predominancia de las bacterias rizosféricas sobre las endófitas también fue reportada por Corrales & Lumbres (2017) en muestras de verdolaga y puede ser explicada por la presencia de endófitas facultativas que alternan su ciclo de vida en la planta y en el suelo

rizosférico. Las endófitas a menudo se encuentran en el suelo, luego infectan las plantas y se diseminan rápidamente en los espacios intercelulares de las raíces. Aunque existen otros puntos de entrada, las heridas en las raíces son reconocidas como los principales para la colonización bacteriana. Por tanto, las endófitas que infectan las plantas deben ser colonizadoras competentes en las raíces (Hardoim et al., 2008).

El número de cultivos de bacterias endófitas diazotróficas obtenidos de tallos fue diferente al de raíces. De manera similar, Hernández (2015) obtuvo 84 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno procedentes de tallos y 75 de hojas. Por el contrario, Bacon & Hinton (2006) mencionados por Beracochea (2011) concluyeron que la presencia de endófitos está descrita para todos los órganos vegetales, pero existe un mayor número en las raíces, disminuyendo a la medida que ascienden al tallo hasta llegar a las hojas, inflorescencias y frutos.

Las bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno se identificaron fenotípicamente, al igual que García (2012b) y German (2015), respetivamente. En las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno se identificaron los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* y *Gluconacetobacter*, reportados previamente en maíz (Altamirano & Plasencia, 2014) y arroz (De la Cruz & Mestanza, 2014). Estos géneros de bacterias también fueron identificados como endófitos en espárrago (*Azospirillum*), caña de azúcar (*Gluconacetobacter*), maíz y arroz (*Burkholderia*, *Herbaspirillum*) por García (2012a), García (2012b) y Altamirano et al. (2014), respectivamente.

En las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno se identificaron los géneros *Derxia*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*, reportados previamente en verdolaga por Corrales & Lumbres (2017). Estos géneros de bacterias también fueron identificados como rizosféricas en olivo (*Azotobacter*, *Burkholderia*), caña de azúcar (*Azotobacter*) y arroz (*Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*) por Clavijo et al. (2012), German (2015) y Altamirano et al. (2014), respectivamente.

El género *Azospirillum* predominó en las bacterias endófitas y rizosféricas, fijadoras de nitrógeno, coincidiendo con Ramírez & Ugaz (2014) y Hernández (2015) en arroz y Altamirano & Plasencia (2014) en maíz. Este género bacteriano

es considerado representante de las endófitas facultativas, que colonizan tanto el suelo rizosférico como el interior de las raíces (Toniutti & Fornasero, 2008).

Las bacterias aisladas de espárrago fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y sintetizaron indoles, al igual que bacterias aisladas de arroz (Ji et al., 2013 y Mbai et al., 2013). La concentración máxima de amonio: 37,52ppm correspondió a *Herbaspirillum* sp.JNFb19ER, superando el rango 20-32 ppm reportado por Baiocchi & Saavedra (2011), Casos & Santiago (2013), Altamirano & Plasencia (2014) y De la Cruz & Mestanza (2014), para *Azospirillum* spp. aisladas de tomate, malezas, maíz y arroz, respectivamente. En la presente investigación mediante la técnica de Berthelot o fenol-hipoclorito se realizó una medición indirecta del nitrógeno fijado como amonio (Lara et al., 2007); no obstante, también se puede realizar una medición directa con la técnica de reducción de acetileno, ARA (Orozco & Martínez, 2009; Obando, 2012).

La capacidad para crecer en medios de cultivo sin nitrógeno y la cuantificación del amonio producido por la fijación de nitrógeno *in vitro*, caracterizaron a las bacterias fijadoras de nitrógeno, coincidiendo con Corrales & Lumbres (2017); no obstante, la diazotrofia se verifica por la presencia del gen estructural de la nitrogenasa: nif H (Beracochea, 2011; Altamirano et al., 2014). El complejo nitrogenasa esta compuesto por la dinitrogenasa reductasa, que es una proteína con hierro y la dinitrogenasa que contiene un cofactor metálico, generalmente compuesto de hierro y molibdeno, donde ocurre la reducción de nitrógeno (de Bashan et al., 2007).

La concentración máxima de fósforo soluble (34,53) correspondió a *Azotobacter* sp.LG16.28AR superando ampliamente el rango 5,40-6,06ppm registrado por Rojas (2013) y Corrales & Lumbres (2017) para *Azotobacter* spp. aislados de malezas y verdolaga, respectivamente. La capacidad de las bacterias diazotróficas para solubilizar fosfato tricálcico también fue demostrado por Beracochea (2011) en medio sólido. Este investigador determinó que las bacterias endófitas diazotróficas previamente aisladas de raíces, tallos y hojas de maíz solubilizaron fosfato en agar NBRIP, observándose halos con índices de solubilización de 1,4-3,2.

La concentración máxima de indoles (199,02ppm), se alcanzó con *Azospirillum* sp.NFb15RM superando ampliamente el rango 46-142ppm registrado por Clavijo et al. (2012) para bacterias diazótrofes aisladas de la rizósfera de olivo. Según de Bashan et al. (2007) las cepas de *Azospirillum* spp. producen diversas hormonas vegetales cuando se cultivan en medios líquidos: ácido indol-3-acético, indoláctico, indol-3-butírico, indol-3-etanol, indol-3-metanol y compuestos de indol no identificados, además de giberelinas, ácido abscísico y citoquininas. Los indoles se cuantificaron mediante la reacción colorimétrica de Salkowsky, específica para indoles que agrupan el ácido indolacético (Celis & Gallardo, 2008).

La capacidad para fijar nitrógeno fue una de las primeras características a las que se le atribuyó la promoción de crecimiento por bacterias rizosféricas y endófitas como *Azospirillum* spp. (de Bashan et al., 2007); no obstante, investigaciones posteriores demostraron que estas bacterias también producen indoles (Corrales & Lumbres, 2017), solubilizan fosfatos (García et al., 2010) e inclusive ejercen antagonismo frente a fitopatógenos (Casos & Santiago, 2013). En este contexto, los cultivos de las bacterias diazotróficas que alcanzaron los mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles se seleccionaron, coincidiendo con Obando (2012), Rojas & Vásquez (2014), Corrales & Lumbres (2017); sin embargo, también se pueden seleccionar solo por los indoles producidos (Lara et al., 2011), nitrógeno fijado y fosfato solubilizado (Reyes et al., 2008), fosfato solubilizado, indoles producidos y efecto en la germinación (Clavijo et al., 2012) y actividad promotora de crecimiento (Angulo et al., 2014).

Las bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato y productoras de indoles incrementaron el desarrollo vegetativo de las plantas de espárrago, demostrándose su potencial como promotoras de crecimiento (PGPR), como se ha reportado previamente en tomate (Mena et al., 2009; Escobar et al., 2011; Luna et al., 2013) y otros cultivos agrícolas como arroz (García et al., 2010; Mbai et al., 2013), *Triticum aestivum* L. “trigo” (Aly et al., 2012), maíz (Naz et al., 2012; Moreno & Galvis, 2013) y quinua (Ortuño et al., 2013). García (2012b) utilizó plantas de *Raphanus sativus* L. “rabanito” para investigar el efecto de bacterias diazotróficas

endófitas identificadas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* y observó diferencias significativas en la longitud de las plantas (28-29cm) y área foliar (209-224cm²) en los tratamientos inoculados, en comparación con el testigo (19cm y 168cm², respectivamente), concluyendo que la fijación de nitrógeno por las bacterias inoculadas puede ser medida indirectamente mediante el efecto promotor en plantas de rabanito después de 28 días.

Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas mediante mecanismos directos e indirectos. Los directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas), solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno atmosférico (Mantelin & Touraine, 2003; Loredó et al., 2004; Lara et al., 2007). Los mecanismos indirectos son responsables del biocontrol de patógenos (Kloepper et al., 2004; Hernández et al., 2009; Bhattacharyya & Jha, 2012). Según la “Hipótesis aditiva” el efecto de las PGPR se atribuye a más de un mecanismo involucrado en la asociación planta-bacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas (Bashan et al., 2007).

Las bacterias diazotróficas incrementaron la altura de las plantas. Este resultado también fue reportado por German (2015), García (2012b) y Corrales & Lumbres (2017). Asimismo, existen reportes de incremento en la germinación de semillas de *Medicago sativa* L. “alfalfa” (Clavijo et al., 2012) y *Setaria lachnea* (Toniutti & Fornasero, 2008); longitud de radículas, peso de la biomasa aérea y radicular de maíz (Beracochea, 2011), volumen de la raíz (Rangel et al., 2011); longitud radicular, porcentaje de nitrógeno en hojas y raíces de *S. lachnea* (Toniutti & Fornasero, 2008) y rendimiento de cultivos agrícolas (Ashrafi & Seiedi, 2011; Jarak et al., 2012; Piscoya & Ugaz, 2016).

El efecto positivo de las PGPR está relacionado con aumento en la longitud de raíces laterales, número y longitud de pelos radicales, cambios que se asocian con la síntesis de auxinas, citoquininas y giberelinas. La auxina AIA sintetizada por las bacterias es tomada por la planta y junto con el AIA endógeno, pueden estimular la división y alargamiento de las células o bien promover la síntesis de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del

etileno, que a su vez inhibe la elongación de las raíces y retrasa su crecimiento (Aguado, 2012). Las PGPR utilizan el ACC como fuente de nitrógeno y mediante la ACC desaminasa, lo hidrolizan en alfa-cetobutirato y amoníaco (Glick et al., 2007). Consecuentemente, el ACC disminuye, el etileno se reduce y los pelos radicales se incrementan significativamente (Loredo et al., 2004).

Las bacterias endófitas alcanzaron los mayores índices de efectividad en la altura de las plantas, coincidiendo con Moreno (2012). Este investigador manifestó que considerándose que se encuentran en contacto íntimo con las plantas, se espera que las bacterias endófitas brinden beneficios más directos a su hospedero, en comparación con las bacterias rizosféricas, ya sea secretando factores de estimulación de crecimiento al interior de las plantas o protegiéndolas mas efectivamente contra los fitopatógenos. El interior de las plantas es propicio para la fijación biológica de nitrógeno (fuentes de carbono y mínima concentración de oxígeno) favoreciendo la reducción del nitrógeno y liberación directa a las plantas (Moreno, 2012). Por su parte, Beracochea (2011) explicó que las bacterias endófitas habitan principalmente los espacios intercelulares, que son ambientes ricos en azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos e iones inorgánicos, suficientes para sustentar el crecimiento microbiano. A su vez, los microorganismos se encuentran protegidos del estrés ambiental y se encuentran en un lugar óptimo para el intercambio metabólico.

Los mayores índices de efectividad en la altura a los 30, 45 y 60 días, se alcanzaron con las bacterias de género *Azospirillum*, inicialmente reconocidas por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (de Bashan et al., 2007). Actualmente destacan por la producción y liberación de reguladores de crecimiento (Guzmán et al., 2012), pero también se ha reportado solubilización de fosfatos (García et al., 2010) e inclusive control biológico de fitopatógenos (Casos & Santiago, 2013). Las especies de *Azospirillum* spp. ejercen sobre la planta un efecto multiparamétrico, observándose incremento en la germinación, desarrollo de raíces, altura, tamaño de hojas y precocidad en la floración (Córdova, 2016).

Los índices de efectividad de *Azospirillum* spp.LGI23ET, NFb3ET; *Herbaspirillum* sp.19ER y *Azotobacter* sp.LG16.28 superaron inclusive al testigo

químico, coincidiendo con Piscoya & Ugaz (2016). Por el contrario, Rangel et al. (2011) observaron que *Azospirillum* sp. disminuyó el volumen de la raíz en 38-45% respecto al fertilizante nitrogenado ($60-120\text{kg ha}^{-1}$), pero si lo incrementó ($6,9-11,7\text{cm}^3$) respecto al testigo absoluto ($6,8-10,6\text{cm}^3$). Asimismo García (2012a) no encontró un patrón definido de acción de bacterias diazótrofes endófitas en tomate, obteniéndose efectos no significativos en la inoculación simple y doble de *Azospirillum* sp. en tomate. Por su parte, Yasari et al. (2008) observaron que un biofertilizante constituido por *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. no afectó significativamente el rendimiento de *Brassica napus* L., pero cuando se aplicó junto a fertilizante químico nitrogenado o fosfatado o con ambos, el aumento en el rendimiento fue significativo. También se ha reportado que con *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Herbaspirillum* se disminuyó el fertilizante químico (25-50%) sin afectar el rendimiento de los cultivos agrícolas (de Bashan et al., 2007; Sánchez et al., 2014; Piscoya & Ugaz, 2016). En este contexto, el efecto de *Azospirillum* spp. LG123ET y NFb3ET; *Herbaspirillum* spp. JNFb19ER, JNFb23ER y *Azotobacter* sp. LG16.28AR en el desarrollo vegetativo y rendimiento de espárrago debe ser investigado en condiciones de campo (Carreño, 2009), para constituir biofertilizantes que puedan ser aplicados solos o en conjunto con dosis disminuidas de fertilizante químico.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ En raíces, tallos y suelo rizoférico de plantas de espárrago se obtuvieron bacterias fijadoras de nitrógeno: 80 endófitas de raíz, 110 endófitas de tallo, así como 111 rizosféricas aerobias y 101 rizosféricas microaerófilas.
- ✓ En los 402 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces, tallos y suelo rizoférico de espárrago se identificaron los géneros *Azospirillum* (37,8%), *Herbaspirillum* (16,2%), *Burkholderia* (14,6%), *Derxia* (11,7%), *Azotobacter* (8,5%), *Beijerinckia* (7,5%) y *Gluconacetobacter* (3,7%).
- ✓ Las bacterias endófitas y rizosféricas fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y produjeron indoles, cuantificándose 0,21-37,52ppm de amonio; 0,71-34,53ppm de fósforo soluble y 15,80-199,02ppm de indoles.
- ✓ Los cultivos de bacterias endófitas y rizosféricas seleccionadas correspondieron a *Herbaspirillum* sp.19ER y *Azospirillum* sp.23ET con 37,52 y 29,25ppm de amonio; *Herbaspirillum* sp.23ER con 25,94ppm de amonio, 24,84ppm de fósforo soluble y 46,91ppm de indoles; *Azospirillum* sp.3ET con 17,85ppm de amonio, 29,75ppm de fósforo soluble y 89,13ppm de indoles y *Azotobacter* sp.16.28AR con 35,69ppm de amonio, 34,53ppm de fósforo soluble y 22,47ppm de indoles.
- ✓ Las bacterias seleccionadas, incrementaron la altura y número de tallos de las plantas de espárrago con índices de efectividad de 7,87-78,37% y 24,8-275,9% respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de *Azospirillum* spp. LGI23ET, NFb3ET; *Herbaspirillum* spp. JNFb19ER, JNFb23ER y *Azotobacter* sp. LG16.28AR en el desarrollo vegetativo y rendimiento de espárrago en condiciones de campo.
- ✓ Investigar sustratos orgánicos de bajo costo para el incremento masivo de las bacterias promotoras de crecimiento en espárrago.
- ✓ Identificar a nivel molecular las bacterias promotoras de crecimiento en espárrago.

VIII. RESUMEN

En raíces, tallos y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” se aislaron bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno, para demostrar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Los medios de cultivo sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fueron NFb, LGI, JNFb, LGI-P y JMV para endófitas y rizosféricas microaerófilas y LG, LGD y BEIJ para rizosféricas aerobias. Las bacterias se identificaron fenotípicamente y se cuantificó el amonio, fósforo soluble e indoles producidos *in vitro*. Los cinco cultivos de bacterias que alcanzaron los mayores valores se inocularon en coronas de espárrago cultivar UC-157F2 y se determinó el efecto en la altura y número de tallos, durante 60 días en invernadero. Se obtuvieron bacterias fijadoras de nitrógeno: 80 endófitas de raíz, 110 endófitas de tallo, así como 111 rizosféricas aerobias y 101 rizosféricas microaerófilas. En los 402 cultivos de bacterias, se identificaron *Azospirillum* (37,8%), *Herbaspirillum* (16,2%), *Burkholderia* (14,6%), *Dexia* (11,7%), *Azotobacter* (8,5%), *Beijerinckia* (7,5%) y *Gluconacetobacter* (3,7%). Las bacterias fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y produjeron indoles, cuantificándose 0,21-37,52ppm de amonio; 0,71-34,53ppm de fósforo soluble y 15,80-199,02ppm de indoles. *Herbaspirillum* spp.19ER y 23ER; *Azospirillum* spp.23ET y 3ET y *Azotobacter* sp.16.28AR, incrementaron la altura y número de tallos de las plantas de espárrago con índices de efectividad de 7,87-78,37% y 24,8-275,9% respectivamente. Se demostró la promoción de crecimiento de las plantas de espárrago por bacterias fijadoras de nitrógeno.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, S. (Ed.). (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP/Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA.
- Altamirano, C. & Plasencia R. (2014). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de Zea mays L., en Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Altamirano, C., Carreño, C., Plasencia, V., Ramírez, L., Silva, J. & Ugaz, F. (2014). *Bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Alvarado, P. & Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Reque en Lambayeque, marzo-mayo, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Aly, M., El-Sayed, H. & Jastaniah, S. (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. *Journal of American Science*, 8(5), 667-676.
- Angulo, V., Sanfuentes, E., Rodríguez, F. & Sossa, K. (2014). *Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338-347.

- Ashrafi, V. & Seiedi, M. (2011). Influence of different plant densities and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attributes of corn (*Zea mays* L.) *Recent Research in Science and Technology*, 3(1), 63-66.
- Asprelli P., López F. & Cointry E. (2005). Caracteres agronómicos en el cultivo de espárrago de diferentes edades y manejos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40(1), 47-52.
- Baca, B., Soto, L., & Pardo, M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*, 38, 43-49.
- Baca, K., Sánchez, M., Carreño, C. & Mendoza, G. (2010). Polihidroxialcanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" y *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 213-224.
- Baiocchi, A & Saavedra, A. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.). en invernadero* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Barloco, C. (2008). *Bacterias endófitas de maíz (Zea mays L.): caracterización y detección del gen nifH*. (Tesina de grado). Universidad de la República, Uruguay.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas – diazótrofes nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Uruguay.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Cadena, S. & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.

- Cárdenas, D., Garrido, R., Bonilla, R., & Baldani, V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. En pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3), 1.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Casos, J. & Santiago, P. (2013). *Potencial promotor del crecimiento de plantas de las especies de Azospirillum aisladas de raíces de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Castagnino A.; Díaz K.; Sastre P.; Rosini M. & Sasale S. (2011). La densidad y tamaño de plántulas con cepellón en la producción de espárrago verde. *Agronomía Mesoamericana*, 22 (1), 63-70.
- Celis, L. & Gallardo, I. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y giberelinas) en cultivos microbianos*. (Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zuñiga, D. & Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 89-102.
- Córdova, L. (2016). *Efecto de Azospirillum spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz", en invernadero* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Corrales, M. & Lumbres, M. (2017). *Bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de Portulaca oleracea L. como potenciales promotoras del crecimiento de plantas en suelos con salinidad*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Coyne M. (2000) *Microbiología del Suelo. Un enfoque exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.

- Dávila, J. (2004). *Elementos para una agricultura organica e introducción de cultivos alternativos para suelos con problemas de salinidad*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- De Bashan, L., Holguin, G., Glick, B. & Bashan, Y. (2007). *Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales*. En Ferrera, R. & Alarcon, A. Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. (170-224). México: Trillas.
- De La Cruz, E. & Mestanza, A. (2014). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de Oryza sativa L., arroz, en Lambayeque, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Delgado, A. (2007). *Producción y comercialización de espárrago en el valle de Virú*. (Tesis de Maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú.
- Delgado, Y., Cupull, R., Pérez, C., Sánchez, A. & Vílchez, M. (2003). Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*, 30(1), 26-32.
- Dibut, B., Ortega, M., Martinez, R., Fey, L. & Rios, Y. (2005). Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 26(2), 5-10.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49.
- Eskin, N. (2012). *Colonization of Zea mays by the nitrogen fixing bacterium Gluconacetobacter diazotrophicus*. (Degree of Master). Western University London, Ontario, Canada.
- Farías, V., Krarup, C. & Contreras, S. (2004). Efectos de población sobre rendimiento y calidad de turiones de cuatro cultivares de espárrago. *Scientia Agropecuaria*, 31(2), 119-127.

- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C. & Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto en el desarrollo de Oryza sativa L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 107-116.
- García, M. (2012a). *Efecto de la inoculación con bacterias diazotróficas de vida libre endófitas sobre el crecimiento de Lycopersicum esculentum "Tomate"*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- García, M. (2012b). *Raphanus sativus L. "rabanito" como modelo para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de bacterias diazotróficas endófitas. Trujillo, La Libertad. Marzo – Agosto 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociados a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Colombia.
- Gatti, I., Cravero, V., López, F. & Cointry, E. (2000). Evaluacion de siete poblaciones de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 35, 1151-1157.
- Germán, J. (2015). *Efecto de las concentraciones de Azotobacter sp. aislado de rizósfera de suelo de Saccharum officinarum sobre el crecimiento de Lycopersicum esculentum "tomate"*. (Tesis de Biólogo-Microbiólogo). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Glick, B., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duam, J. & McConkey, B. (2007). Promoting of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Science*, 26, 227-242.

- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 182-190.
- Hardoim, P., Overbeek, L. & Elsas, J. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463-471.
- Hernández, A. Heydriej, M., Rojas. M, Manzano, J, Trujillo, I., Gonzales, M. & Acebo, Y. (2009). *Metodología para el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la biotecnología agrícola*. Recuperado en [http://www.foruncyt.cu/User Filos/Forum Textos0300297Pdf](http://www.foruncyt.cu/User_Filos/Forum_Textos0300297Pdf) 5 de agosto (2010).
- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 42-49.
- Hernández, E. (2015). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de tallos y hojas de Oryza sativa L. "arroz", Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. (5^{ta} ed.) México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Stanley, J. & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9th ed.) Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jarak, M., Mrkovacki, N., Bjelic, D., Josic, D., Hajnal- Jafari, T. & Stamenov, D. (2012). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27), 5683-5690.

- Jha, B., Thakur, M., Gontia, I., Albrecht, V., Stoffels, M., Schmid, M., Hartmann, A. (2009). Isolation, partial identification and application of diazotrophic *rhizobacteria* from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45, 62-72.
- Ji, S., Gurunani, M., & Chun, S. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169(1), 83-98.
- Kirschenbilder, E., Castagnino, A., Díaz, K., Rosini M. & Falavigna A. (2015). Cadena espárrago: producción de diferentes genotipos en su quinto año y comportamiento en poscosecha. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 99-109.
- Kloepper, J., Ryu, C. & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94, 1259-1266.
- Koomnok, CH., Teaumroong, N., Rerkasem, B. & Lumyong, S. (2007). Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. *Science Asia*, 33, 429-435.
- Lara, C., Oviedo, L. & Betancur, C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29 (2), 187-194.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX (2), 6-14.
- Loaces, I. (2011). *Caracterización de bacterias endófitas productoras de sideróforos en arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Maestría). Universidad de la República, Uruguay.
- Loredo, C., López, L. & Espinosa, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22 (2), 225-239.

- Luna, L., Martínez, R., Hernández, M., Arvizu, S. & Pacheco, J. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnológica Mexicana*, 36(1), 63-69.
- Mano, H. & Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and Environments*, 23 (2), 109-117.
- Mantelin, S. & Touraine, B. (2003). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 27-34.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Marra, L., Graziotti, P., Nunes, U. & de Souza, F. (2012). Diazotrophic bacteria in star flowers. *Bioscience Journal Uberlândia*, 28(1), 17-24.
- Marrero, M., Agaras, B., Wall, L. & Valverde, C. (2015). Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplaneo de distintas especies cultivadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 132-137.
- Massena, R., dos Santos K. & Osvaldo, R. (2011). What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant growth promoting bacteria?. *Bacteria in Agrobiological*, 1, 123-138.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Mbai, F., Magiri, E., Matiru, V., Ng'ang'a, V., & Nyambati V. (2013). Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *American International Journal of Contemporary Research*, 3(4), 25-40.
- Mehnaz, S., Weselowski, B. & Lazarovits, G. (2006). Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. *Syst Appl Microbiol*, 29(6), 496-501.

- Mena, H., Cruz, A., Paredes, O., Gómez, M. & Portugal, V. (2009). Fruit texture related changes and enhanced shelf-life through tomato root inoculation with *Bacillus subtilis* BEB-13BS. *Agrociencia*, 43(6), 559-557.
- Menezes, C. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazotólicas asociadas a maíz (Zea mays) variedad PAU 871*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Uruguay.
- Ministerio de Agricultura y Riego, MINAGRI, 2014. Producción de espárragos en el Perú. Recuperado de:
<http://larepublica.pe/impresia/economia/701334-la-libertad-ocupa-el-primer-lugar-en-produccion-de-esparragos>
- Moreno, B. (2012). *La rizósfera y las relaciones entre plantas y los microorganismos*. En: G. Aguado (Ed). Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la Agricultura, (pp 23-33.). México: Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP/Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA.
- Moreno, L. & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazóticas aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36 (1), 33-37.
- Municipalidad Provincial de Virú, 2016. Recuperado de: www.muniviru.gob.pe
- Naz, L. Bano, A., Rehman, B., Pervaiz, S., Iqbal, M., Sarwar, A. & Yasmin, F. (2012). Potencial of *Azotobacter vinelandii* Khsrl as bio-inoculant. *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10368 – 10372.
- Obando, D. (2012). *Respuesta fisiológica de frijol caupí (Vigna unguiculata L.) Walp a la coinoculación de bacterias diazotólicas de los géneros Azotobacter y Rhizobium en suelos del departamento del Cesar*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Orozco, C. & Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque*, 30(2), 70 - 77.

- Ortuño, N., Castillo J., Claros M., Navia O., Angulo M., Barja D., Gutiérrez C. & Angulo V. (2013). Enhancing the sustainability of quinoa production and soil resilience by using bioproducts made with native microorganisms. *Agronomy*, 3, 732-746.
- Pedraza, R., Bellone, C., & de Bellone, C. (2010). *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*, 45,36-43.
- Pérez, A, Rojas., J. & Fuentes, J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a las raíces del pasto colosuaña (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del /departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228.
- Piscocoya, E. & Ugaz, Z. (2016). *Efecto de Azospirillum, Azotobacter y Enterobacter spp. nativas con 50% de fertilizante químico en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. "maíz" amarillo duro en Lambayeque, 2013.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Puicón, H. (2014). *Efecto de Pseudomonas spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en condiciones de invernadero, 2013.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Punschke, K., & Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 19-26.
- Ramírez, L. & Ugaz, J. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz".* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Rangel, J., Rodríguez, M., Ferrera, R., Castellanos, J., Ramírez, R. & Alvarado, E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.

- Reyes, I., Álvarez, L., El-Ayoubi, H. & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20 (1), 37-48.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.
- Rojas, J. & Vásquez, J. (2014). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de las rizósfera de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Rojas, L. (2013). *"Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz", en Lambayeque, 2013"*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus*. (Degree of Master). The Islamic University, Gaza.
- Sánchez, J., Lopez, I., Villegas, J. & Montaña, N. (2014). Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria* 5, 17-23.
- Sánchez, S. (2008). *Especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales pesados de un ecosistema contaminado*. (Tesis de Maestría). Universidad Agraria la Habana, Cuba.
- Schoebitz, M., (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico modelo género Azospirillum spp.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, 2010. Uso de Fertilizantes. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documens/fichasaapt/uso%20de%20fertilizantes>.

- Toniutti, M. & Fornasero, L. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria lachnea* (Nees) Kunth. *Revista FAVE- Ciencias Agrarias*, 7(1-2), 33-41.
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Yasari, E., Azadgoleh, E., Pirdashti, H. & Mosafari, S. (2008). *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculants and biofertilizers in Canola (*Brassica napus* L.) cultivation. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7 (5), 490-494.
- Zahar, F., Marol, C., Berge, O., Rangel, J., Prosser, J., Balesdent, J., Heulin, T. & Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2, 1221 – 1230.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (en Vásquez et al., 2012)

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,06)^2}$$

$$n = 96,04 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

Z = 1,96 ($\alpha = 0,05$) valor estándar

p = Prevalencia de bacterias endófitas y rizosféricas promotoras de crecimiento en plantas (0,90).

q = 1-p, ausencia (0,10).

T= Error estimado (6%).

ANEXO 2

Medios de cultivo y soluciones para el aislamiento, identificación y mantenimiento de bacterias rizosféricas y endófitas (en Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2012)

a. Medio de cultivo LG (*Azotobacter* spp. y *Azomonas* spp.)

El medio LG fue elaborado por Lipman (1904)

Componentes	gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,02
Fe Cl ₃ .2H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002
KH ₂ PO ₄	0,15
CaCO ₃	1,00
Sacarosa	20,0
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5,00mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar agar.

b. Medio de cultivo BEIJERINCKIA (*Beijerinickia* spp.)

Componentes	gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,80
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005
KH ₂ PO ₄	0,20
ZnSO ₄ .6H ₂ O	0,005
CuSO ₄ .6H ₂ O	0,004
Glucosa	10,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH y adicionar 15g de agar agar. Esterilizar la glucosa por separado (10g en 50mL de H₂O) y mezclar después de frío.

c. Medio de cultivo LGD (*Derxia* spp.)

El medio LGD o medio LG (Lipman, 1094) fue modificado por Campêlo & Döbereiner (1970)

Componentes	gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,01
Fe Cl ₃ .2H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002
KH ₂ PO ₄	0,15
NaHCO ₃	1,00
Glucosa	20,0
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5,00mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar agar.

d. Solución tampón fosfato de potasio, 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0

Componentes	gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	9,304
KH ₂ PO ₄	8,709
Agua destilada csp	1000mL

Verificar el pH 7,0 y autoclavar.

e. Agar nutritivo (AN)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada csp	1000mL

f. Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* y *A. halopraeferens*)

Componentes	g ^L ⁻¹
Ácido málico DL	5,0
K ₂ .HPO ₄	0,5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02g
Solución de micronutrientes I	2mL
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
KOH	4,5g

Pesar los compuestos en el orden indicado, posteriormente completar el volumen a 1000mL con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 - 6.8. Para el medio semisólido agregar 1,75 - 1.8g de agar agar^L⁻¹ y para el medio sólido 15g de agar agar^L⁻¹ y 20mg^L⁻¹ de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Solución de micronutrientes I:

Componentes	g ^L ⁻¹
CuSO ₄	0,04
ZnSO ₄	1,20
H ₃ BO ₄	1,40
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,00
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175

Completar el volumen a 1000mL con agua destilada.

FeEDTA (Solución 1,64%)

Preparar una solución madre con 7,0g de Fe SO₄.7H₂O y 2g de EDTA dipotásico en 1L de agua destilada. Luego, tomar 1,17mL de la solución madre y completar a 1L con agua desmineralizada, para obtener la solución 1,64% de Fe deseada.

g. Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*)

El medio de cultivo LGI, fue desarrollado a partir del medio LG (Lipman, 1904). La I hace referencia al investigador J. Ivo Baldani. Este medio promueve el aislamiento de *Azospirillum amazonense*.

Componentes	g ^L ⁻¹
Cristales de azúcar	5,0
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄ .2H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002
KH ₂ PO ₄	0,6
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N)	5mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 6,0–6,2. Para medio semisólido adicionar 1,75g de agar agarL⁻¹, para medio sólido 15g de agarL⁻¹ y 20mgL⁻¹ de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

h. Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum* spp.)

El medio JNFb fue desarrollado por la investigadora Johanna Döbereiner a partir del medio NFB. La J hace referencia a la investigadora.

Componentes	g ^L ⁻¹
Acido málico	5.0
K ₂ HPO ₄	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0.1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
Solución de micronutrientes I	2mL
KH ₂ PO ₄	1,8

Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (Solución 1,64 %)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
KOH	4,5
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5,8. Para medio semisólido agregar 1,8g de agarL⁻¹, para medio sólido 18g de agar agarL⁻¹, 20mgL⁻¹ de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 6mL de azul de bromotimol.

i. Medio de cultivo LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)

Este medio fue desarrollado a partir del medio de cultivo LGI (Baldani, 1984), en donde la P hace referencia a Pernambuco, lugar de aislamiento de la primera cepa de *Acetobacter diazotrophicus*.

Componentes	gL ⁻¹
Cristales de azúcar	100
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	0,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5mL
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,01mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5.5. Para medio semisólido agregar 1,8g de agarL⁻¹, para medio sólido 17g de agar agarL⁻¹ y 20mgL⁻¹ de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

j. Medio de cultivo JMV (*Burkholderia* spp.)

Componentes	gL ⁻¹
Manitol	5,0
K ₂ HPO ₄	0,6
KH ₂ PO ₄	1,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (solución 1,64%)	2,1mL
Solución de micronutrientes II	2mL
Solución de vitaminas II	2mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5,0.

Para obtener la solución de vitaminas II, diluir una pastilla de complejo B comercial en 10mL de agua destilada.

Solución de micronutrientes II:

Componentes	gL ⁻¹
ZnSO ₄	0,1
MnCl ₂ .2H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
Agua destilada csp	1000mL

k. Caldo extracto de suelo al 10% (en García et al., 2010)

Componentes	gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,4
MgCl ₂	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
FeCl ₃	0,01
CaCl ₂	0,1
Triptona	1,0
Extracto de levadura	1,0
Extracto de suelo al 10%	250mL
Agua destilada	750mL

Ajustar a pH 7,3 Para obtener extracto de suelo al 10%, depositar en un matraz 250g de suelo agrícola y 500mL de agua destilada. Hervir 2 horas, completar a 500mL con agua destilada y filtrar el sobrenadante. Tomar 25mL del filtrado y completar a 500mL con agua destilada.

**I. Medio de cultivo National Botanical Research Institute, NBRIP
(en Alvarado & Valderrama, 2014)**

Componentes	gL ⁻¹
Glucosa	10,0
Ca ₃ (PO ₂)	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25
KCl	0,2
MgCl ₂ ·H ₂ O	5,0
Agar Agar	15,0
Agua destilada	1000mL

Solucion de antimicótico (en Alvarado & Valderrama, 2014).

Disolver una cápsula de 150mg de Fluconazol en 10ml de alcohol al 95%. Agregar 2mL de solución de antibiótico por litro de medio de cultivo para tener 45mg de Fluconazol por litro.

m. Caldo Tripticasa Soya suplementado con triptófano.

Componentes	gL ⁻¹
Peptona de caseína	17g
Peptona de harina de Soya	3,0
D(+) glucosa (dextrosa)	2,5
Cloruro de sódio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Triptófano	0,01
Agua destilada csp	1000

Disolver por calentamiento y ajustar a pH 7,3

ANEXO 3

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar el ión amonio

a. Reactivos

- **Cloruro de potasio 2M**

Cloruro de potasio	149,12g
Agua destilada	1000mL

- **Solución alcohólica de fenol 10%**

Fenol concentrado	10mL
Alcohol 97°	90mL

- **Nitroprusiato de sodio 0,5%**

Nitroprusiato de sodio	0,5g
Agua destilada	100mL

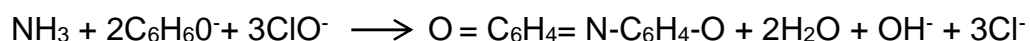
- **Solución oxidante**

Citrato de sodio	20g
Hidróxido de sodio	1g
Hipoclorito de sodio 5% (lejía comercial)	2mL
Agua destilada	100mL

b. Método colorimétrico de berthelot para cuantificar el ion amonio (en Lara et al., 2007)

b.1 Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio (NH_4) con los compuestos fenólicos, en presencia de un agente oxidante, como el hipoclorito de sodio u o-fenol y un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



b. 2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH₄Cl

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100ppm de NH₄Cl, para lo cual se pesa 0,1g de NH₄Cl y se disuelve en 1L de agua bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:

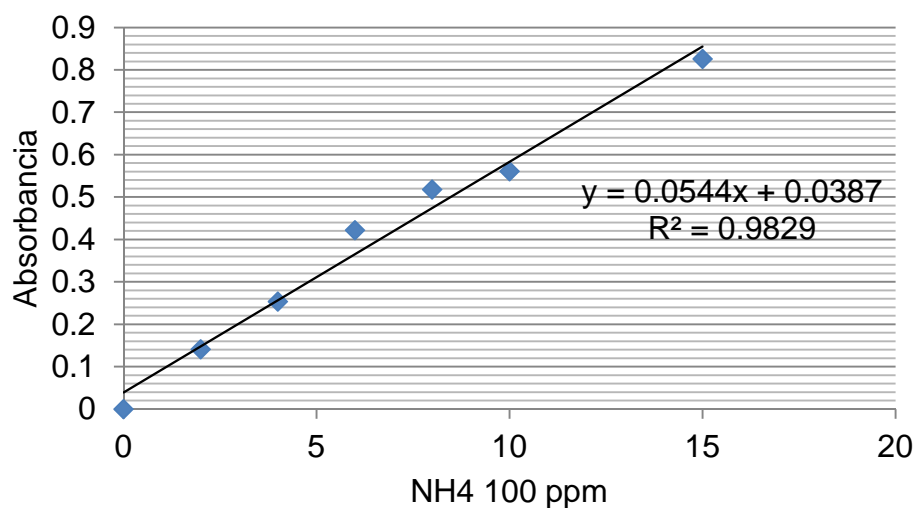
N° de tubo	Solución patrón [mL]	H ₂ O bidestilada [mL]	NH ₄ Cl (Ug/mL = ppm) NH ₄ Cl
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

b.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante, luego agitar para mezclar y dejar en reposo durante 1 hora. Observar una coloración que varía del verde azul al azul intenso según la concentración de amonio. Leer la absorbancia de cada dilución en el espectrofotómetro a 632,9nm. Una vez obtenida la absorbancia de todas las concentraciones de amonio, corregir los valores y mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2010, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

Nº tubo	NH ₄ 100 (ppm)	Absorbancia	Absorbancia corregida
01	0	0,058	0,000
02	2	0,199	0,141
03	4	0,311	0,253
04	6	0,480	0,422
05	8	0,576	0,518
06	10	0,619	0,561
07	15	0,884	0,826

Obtenida la absorbancia de las siete concentraciones de amonio, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2010 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0.0544x + 0.0387$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de amonio en ppm (variable independiente)

Despejar "x" para obtener la cantidad de amonio (ppm) fijado por cada bacteria nativa.

$$x = (y - 0.0387) / (0.0544)$$

ANEXO 4

Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Reactivos

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

Ácido sulfúrico (d = 1,84)	14 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Solución de molibdato amónico 4 %** **20 mL**

- **Solución de ácido ascórbico**

Ácido ascórbico	1,76 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Solución de amético (Preparar al momento del uso)**

Tartrato doble de antimonio y potasio	0,0274 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Reactivo para determinación de ortofosfatos**

Ácido sulfúrico 5 N	40 mL
Solución de Molibdato amónico	12 mL
Solución de ácido ascórbico	24 mL
Solución de emético	4 mL

- **Solución madre de 0,2 mgL⁻¹ de fósforo**

Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 100 °C	877 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Solución hija de 2 mgL⁻¹ de fósforo**

Diluir 1 mL de solución madre en 99 de agua destilada (1/100)

b. Método colorimétrico del Molibdato para cuantificar fósforo soluble (en Rodier & Rodi, 2005)

b.1 Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y

cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

b.2 Limpieza de los recipientes de vidrio

Para la limpieza del material de vidrio no utilizar detergentes que contengan fosfato. Lavados con ácido clorhídrico diluido y enjuagados cuidadosamente con agua destilada.

b.3 Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

Número de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de 2 mgL ⁻¹ (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL ⁻¹	0	0,1	0,2	0,5

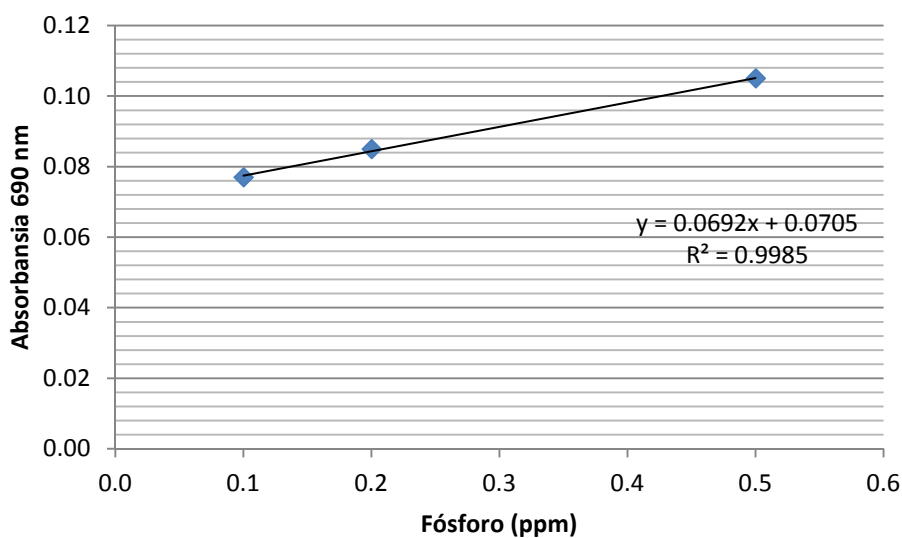
Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm en cubetas de 10 cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2010 para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente (R^2) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

b.4 Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

Introducir 20 mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25 mL. Añadir 4 mL de reactivo indicador, completar el volumen a 25 mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar la lectura en el espectrofotómetro de luz visible con una longitud de onda de 690 nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados en la curva de calibración. Para una muestra de 20 mL, la curva indica el contenido de fósforo expresado en miligramos por litro.

N° de tubo	Fosforo soluble (ppm)	Absorbancia
1	0,1	0,077
2	0,2	0,085
3	0,5	0,105

Una vez obtenida la absorbancia de las tres concentraciones de fosfato dicálcico, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2010 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0692x + 0,071$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fósforo en ppm (variable independiente)

Despejar "x" para obtener la cantidad de fósforo (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,071}{0,0692}$$

ANEXO 5

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles (en Mantilla, 2007)

a. Reactivos

Reactivo de Salkowski (en Garcia & Muñoz, 2010)

H ₂ SO ₄ Concentrado	150mL
Agua destilada	250mL
FeCl ₃ 0,5M en agua destilada	7,5mL

Al momento de la preparación, verter el ácido sulfúrico concentrado en un balón con 25mL de agua destilada y simultáneamente enfriar con cloruro de agua constantemente. Finalmente agregar el cloruro férrico. Utilizar 4mL del reactivo para 1mL de la muestra investigada.

b. Método Colorimétrico de Salkowski para cuantificar indoles

b. 1 Fundamento de la reacción de Salkowski

Mediante la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio de cultivo y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del FeCl₃, originando un compuesto visible de color rosado a rojo en el caso del indolacético. Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indolacético, que pueden ser generados a partir del triptófano.

b. 2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de AIA

Para obtener una curva patrón de ácido indolacético, preparar una solución madre de 100 ppm, para lo cual se pesan 10 mg de ácido indolacético y se disuelven con unas gotas de NaOH en un matraz aforado a 100 mL. A continuación, enrasar con agua bidestilada y agitar hasta homogenizar. Posteriormente se realizan las siguientes diluciones:

N° de tubo	Solución patrón (100 µgmL ⁻¹)	H ₂ O bidestilada [µL]*	Concentración AIA (mgL ⁻¹)
1	0	1000	0
2	20	980	2
3	40	960	4
4	60	940	6
5	80	920	8
6	100	900	10
7	150	850	15
8	200	800	20
9	300	700	30
10	400	600	40
11	500	500	50
12	600	400	60

*1000 µL = 1 mL

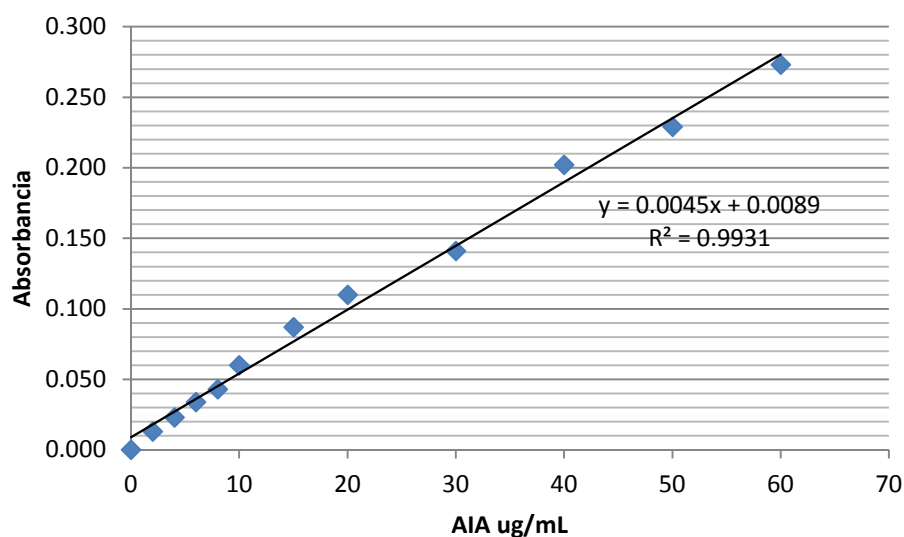
b. 3 Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

Obtenidas las concentraciones parciales de AIA extraer de cada tubo 0,4mL de solución, verter en tubos de 13 x 75 mm y agregar 1,6 mL de reactivo de Salkowski (1:4). Dejar en reposo en oscuridad por 30 minutos. Observar la presencia de una coloración rojiza en los tubos. A continuación, leer la absorbancia de cada dilución en espectrofotómetro a 530 nm.

Una vez obtenida la absorbancia en todas las concentraciones de ácido indolacético, corregir los valores y mediante regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2010, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente (R^2) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

N° de tubo	AIA (µg/mL)	Absorbancia
01	0	0,000
02	2	0,013
03	4	0,023
04	6	0,034
05	8	0,043
06	10	0,060
07	15	0,087
08	20	0,110
09	30	0,141
10	40	0,202
11	50	0,229
12	60	0,273

Obtenida la absorbancia de las doce concentraciones de ácido indol acético, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2010 y y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0045x + 0,0089$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: ácido indol acético en ppm (variable independiente)

Despejar “x” para obtener la cantidad de ácido indol acético (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,0089}{0,0045}$$

ANEXO 6

Temperaturas mínima, media y máxima durante el cultivo de *Asparagus officinalis* L.

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
12/12/16	18,0	22,0	26,0
13/12/16	18,0	22,0	26,0
14/12/16	18,0	22,0	26,0
15/12/16	18,0	21,5	25,0
16/12/16	19,0	22,5	26,0
17/12/16	19,0	22,5	26,0
18/12/16	19,0	22,0	25,0
19/12/16	19,0	22,0	25,0
20/12/16	19,0	22,5	26,0
21/12/16	17,0	21,5	26,0
22/12/16	16,0	21,5	27,0
23/12/16	19,0	23,5	28,0
24/12/16	19,0	22,5	26,0
25/12/16	19,0	23,5	28,0
26/12/16	20,0	23,5	27,0
27/12/16	19,0	23,5	28,0
28/12/16	18,0	22,5	27,0
29/12/16	20,0	24,0	28,0
30/12/16	19,0	23,5	28,0
31/12/16	19,0	23,5	28,0
01/01/17	20,0	24,0	28,0
02/01/17	20,0	24,0	28,0
03/01/17	19,0	24,0	28,0
04/01/17	18,0	24,0	29,0
05/01/17	20,0	25,0	29,0
06/01/17	21,0	25,0	28,0
07/01/17	20,0	24,0	28,0
08/01/17	21,0	25,0	29,0
09/01/17	20,0	24,0	29,0
10/01/17	21,0	26,0	31,0
11/01/17	20,0	24,0	28,0
12/01/17	19,0	24,0	28,0
13/01/17	20,0	25,0	29,0
14/01/17	21,0	25,0	29,0
15/01/17	21,0	25,0	29,0
16/01/17	20,0	25,0	30,0
17/01/17	22,0	26,0	30,0
18/01/17	22,0	26,0	30,0
19/01/17	21,0	25,0	29,0

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
20/01/17	22,0	27,0	31,0
21/01/17	22,0	26,0	30,0
22/01/17	22,0	26,0	30,0
23/01/17	23,0	27,0	31,0
24/01/17	22,0	27,0	31,0
25/01/17	22,0	27,0	31,0
26/01/17	22,0	26,0	29,0
27/01/17	23,0	27,0	31,0
28/01/17	23,0	28,0	32,0
29/01/17	24,0	28,0	31,0
30/01/17	23,0	28,0	33,0
31/01/17	23,0	27,0	30,0
01/02/17	23,0	27,0	30,0
02/02/17	23,0	26,0	29,0
03/02/17	23,0	27,0	30,0
04/02/17	24,0	27,0	30,0
05/02/17	23,0	26,0	29,0
06/02/17	23,0	27,0	30,0
07/02/17	24,0	27,0	30,0
08/02/17	24,0	28,0	32,0
09/02/17	24,0	28,0	31,0
10/02/17	24,0	28,0	31,0
11/02/17	23,0	27,0	30,0
12/02/17	24,0	28,0	31,0
13/02/17	24,0	28,0	31,0

ANEXO 7

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura y el número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 30 días

Tests of Normality Prueba de Kolmogorov-Smirnov

Tratamiento JNFb 19ER		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	60,333	4,333
	Desviación típica	2,5166	1,1547
	Absoluta	,219	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,219	,282
	Negativa	-,189	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,380	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,999	,766

Tratamiento JNFb 23ER		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	48,333	3,333
	Desviación típica	2,0817	,5774
	Absoluta	,292	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,212	,385
	Negativa	-,292	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,506	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,960	,766

Tratamiento LG 16.28		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	53,667	2,333
	Desviación típica	1,5275	,5774
	Absoluta	,253	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,196	,385
	Negativa	-,253	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,991	,766

Tratamiento LGI 23ET		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	53,333	4,000
	Desviación típica	1,5275	1,0000
	Absoluta	,253	,175
Diferencias más extremas	Positiva	,253	,175
	Negativa	-,196	-,175
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,303
Sig. asintót. (bilateral)		,991	1,000

Tratamiento NFb 3ET		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	62,667	5,000
	Desviación típica	7,5719	,0000
	Absoluta	,337	
Diferencias más extremas	Positiva	,241	
	Negativa	-,337	
Z de Kolmogorov-Smirnov		,583	
Sig. asintót. (bilateral)		,886	

Tratamiento Testabs		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	37,000	1,333
	Desviación típica	3,0000	,5774
	Absoluta	,175	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,175	,385
	Negativa	-,175	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,667
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,766

Tratamiento TestQuim		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	51,000	1,667
	Desviación típica	1,0000	,5774
	Absoluta	,175	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,175	,282
	Negativa	-,175	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,667
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,766

Prueba de homogeneidad de varianzas para altura a los 30 días

Contraste de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,517	6	14	,090

Prueba de homogeneidad de varianzas para número de tallos a los 30 días

Contraste de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,431	6	14	,080

ANEXO 8

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura y número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 45 días

Tests of Normality Prueba de Kolmogorov-Smirnov

Tratamiento JNFb 19ER		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	65,000	5,000
	Desviación típica	1,0000	1,0000
	Absoluta	,175	,175
Diferencias más extremas	Positiva	,175	,175
	Negativa	-,175	-,175
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,303
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	1,000

Tratamiento JNFb 23ER		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales ^{b,c}	Media	54,333	4,667
	Desviación típica	2,0817	,5774
	Absoluta	,292	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,212	,282
	Negativa	-,292	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,506	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,960	,766

Tratamiento LG 16.28		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	58,333	3,667
	Desviación típica	1,5275	,5774
	Absoluta	,253	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,253	,282
	Negativa	-,196	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,991	,766

Tratamiento LGI 23ET		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales ^{b,c}	Media	64,000	4,667
	Desviación típica	3,6056	,5774
	Absoluta	,276	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,203	,282
	Negativa	-,276	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,478	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,976	,766

Tratamiento NFb 3ET		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales ^{b,c}	Media	68,667	5,333
	Desviación típica	2,0817	,5774
	Absoluta	,292	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,292	,385
	Negativa	-,212	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,506	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,960	,766

Tratamiento Testabs		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	43,000	2,000
	Desviación típica	2,6458	,0000
	Absoluta	,314	
Diferencias más extremas	Positiva	,225	
	Negativa	-,314	
Z de Kolmogorov-Smirnov		,544	
Sig. asintót. (bilateral)		,929	

Tratamiento TestQuim		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	57,333	2,667
	Desviación típica	,5774	,5774
	Absoluta	,385	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,385	,282
	Negativa	-,282	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,667	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,766	,766

Prueba de homogeneidad de varianzas para altura a los 45 días

Contraste de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,216	6	14	,103

Prueba de homogeneidad de varianzas para número de tallos a los 45 días

Contraste de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,619	6	14	,214

ANEXO 9

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura y número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 60 días

Tests of Normality Prueba de Kolmogorov-Smirnov

Tratamiento JNFb 19ER		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	73,000	6,333
	Desviación típica	1,0000	,5774
	Absoluta	,175	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,175	,385
	Negativa	-,175	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,667
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,766

Tratamiento JNFb 23ER		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	59,333	5,000
	Desviación típica	1,5275	1,0000
	Absoluta	,253	,175
Diferencias más extremas	Positiva	,253	,175
	Negativa	-,196	-,175
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,303
Sig. asintót. (bilateral)		,991	1,000

Tratamiento LG 16.28		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	72,667	6,333
	Desviación típica	1,5275	,5774
	Absoluta	,253	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,196	,385
	Negativa	-,253	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,991	,766

Tratamiento LGI 23ET		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	81,000	5,333
	Desviación típica	2,6458	,5774
	Absoluta	,314	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,314	,385
	Negativa	-,225	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,544	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,929	,766

Tratamiento NFb 3ET		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	80,333	7,333
	Desviación típica	1,5275	,5774
	Absoluta	,253	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,253	,385
	Negativa	-,196	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,991	,766

Tratamiento Testabs		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	55,000	2,667
	Desviación típica	3,0000	,5774
	Absoluta	,175	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,175	,282
	Negativa	-,175	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,667
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,766

Tratamiento TestQuim		altura en cm	Tallos
N		3	3
Parámetros normales	Media	67,333	3,667
	Desviación típica	,5774	,5774
	Absoluta	,385	,385
Diferencias más extremas	Positiva	,385	,282
	Negativa	-,282	-,385
Z de Kolmogorov-Smirnov		,667	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,766	,766

Prueba de homogeneidad de varianzas para altura a los 60 días

Contraste de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,299	6	14	,320

Prueba de homogeneidad de varianzas para número de tallos a los 60 días

Contraste de Levene	gl1	gl2	Sig.
,267	6	14	,944